



TITLE:

ボツリヌス酵素でADPリボシル化
されるGb蛋白質(rho遺伝子産物)に
関する研究(Dissertation_全文)

AUTHOR(S):

関根, 章博

CITATION:

関根, 章博. ボツリヌス酵素でADPリボシル化されるGb蛋白質(rho遺伝子産物)に関する研究. 京都大学, 1993, 博士(薬学)

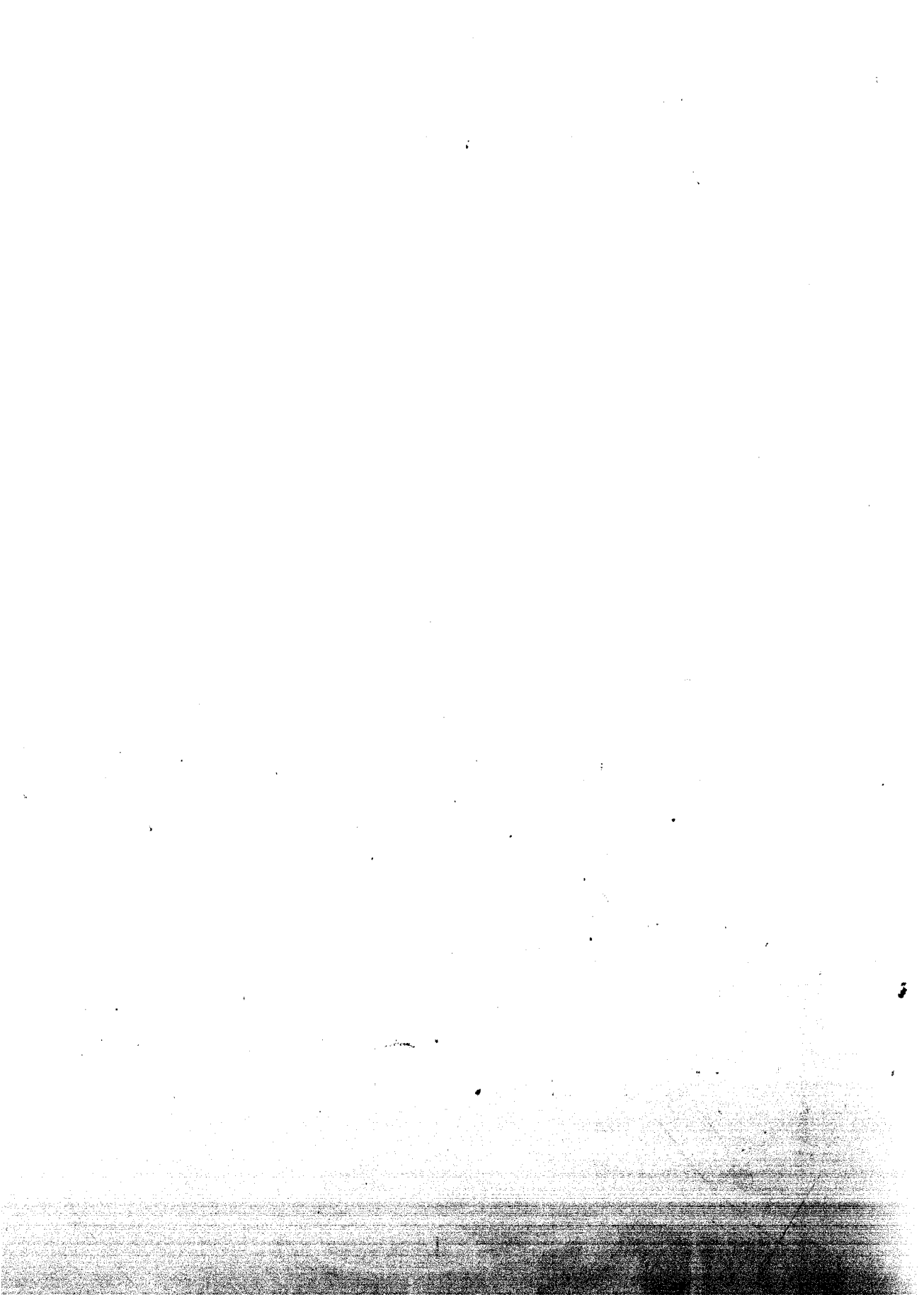
ISSUE DATE:

1993-03-23

URL:

<https://doi.org/10.11501/3066297>

RIGHT:



ボツリヌス酵素でADPリボシ
ル化されるGb蛋白質（rho
遺伝子産物）に関する研究

関 根 章 博



ボツリヌス酵素で A D P リボシル化
される G b 蛋白質（ r h o 遺伝子産
物）に関する研究

関根 章博



目 次

第 1 章	序 論	1
第 2 章	G _b の単離精製	9
	実験の部	24
第 3 章	G _b 蛋白質の同定	32
	実験の部	41
第 4 章	A D P リボース結合部位の決定	44
	実験の部	70
結 語		80
謝 辞		90
文 献		91



第 1 章 序 論

嫌気性菌 *Clostridium botulinum* の産生する毒素は、抗原性の違いによって A、B、C₁、C₂、D、E、F、G の 8 種類に分類されていて [1-3] (Table 1)、そのうちのいくつかは致死率の高いボツリヌス食中毒の原因物質である。また、C₂を除く 7 種の毒素は神経毒で、コリン作動性神経終末に働いてアセチルコリンの放出を阻害して、呼吸困難で死に至らすことが知られている [2]。これらの毒素は菌体内で分子量約 15 万の 1 本鎖ポリペプチドとして合成され、トリプシンあるいはトリプシン様酵素により分子内切断を受けて分子量 10 万の重鎖と 5 万の軽鎖の 2 本鎖分子へ転換され、互いに S-S 結合によって結合している。この毒素作用発現機構は、標的細胞の細胞膜表面にまずその重鎖を結合させ、何らかの機構で軽鎖部分を細胞内に送り込み、その軽鎖が細胞内で作用を発揮して毒性を発現するという 3 ステップ・モデルが提唱されている [2-3]。

一方、細菌毒素が産生する重鎖と軽鎖より構成される毒素のいくつかは ADP リボシルトランスフェラーゼと呼ばれる酵素活性（以下、ADP リボシル化と言う）を有することが知られている。この酵素反応 (Fig. 1) は、ニコチンアミドアデニンヌクレオチド（以下、NAD と略す）のニコチンアミド部分が切断遊離されるとともに、ADP リボースを特異的にその基質蛋白質に転移する反応であり、

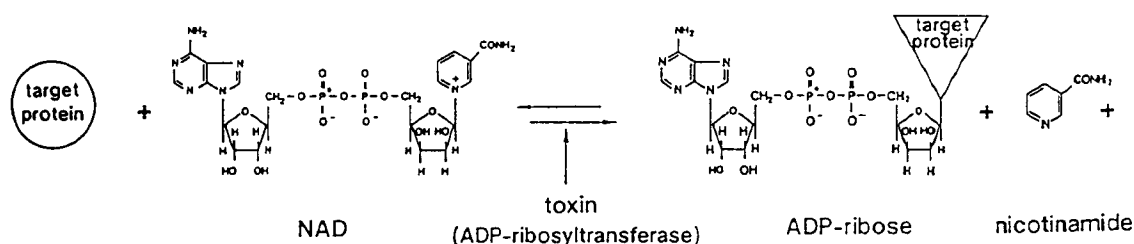


Fig. 1 Mono ADP-ribosylation reaction.

この反応を受けた標的蛋白質は、その生理機能に変化が起こることが知られている[4-7]。これらの根拠に基づき、Narumiyaのグループはボツリヌス毒素による神経毒素活性がADPリボシル化酵素活性に起因することを想定し、マウス脳のホモジネートを [^{32}P] NADと各種ボツリヌス毒素とともにインキュベートし、

Table 1 *Clostridium botulinum* produced botulinum toxins

botulinum toxins			
	A,B,E,F,G toxins	C1 or D toxins	C2 toxin
toxin's form	A,B,E,F or G form	C1 or D form	C1 or D form
gene	unknown	bacteriophage	unknown
preform	single polypeptide	single polypeptide	unknown
activated	L. chain =	L. chain =	component I
form	50,000 kd	50,000 kd	55,000 kd
	H. Chain =	H. Chain =	component II
	100,000 kd	100,000 kd	100,000 kd
cell attachment molecule	heavy chain ?	heavy chain ?	component II
toxic action	light Chain ?	light chain ?	component I
inducer			
toxicity	block of ACh-release		
	block of neurotransmitter		

そのSDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動のオートラジオグラムを行なった[8,9]。その結果、C₁あるいはD毒素が膜画分および可溶性画分に存在する分子量22,000の蛋白質を特異的にADPリボシル化することを見出した(Fig. 2, lane 4-5)。さらに、C₁あるいはD毒素を構成する軽鎖と重鎖のS-S結合を切断する目的で予めジチオスレイトール(DTT)処理を行なうとこれらの毒素によるADPリボシル化活性が上昇することから(Fig. 2)、細胞内で毒性を発現すると言われている軽鎖中にADPリボシル化活性が含有されていて[8,10,11]、この酵素活性がボツリヌス中毒を引き起こすものと考えた。しかし、一方ではC₁やD毒素と同様に

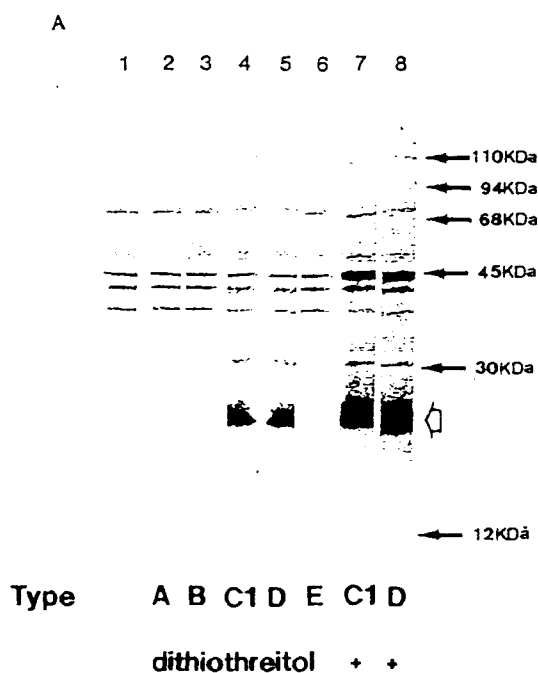


Fig. 2 ADP-ribosylation of mouse brain membranes with various types of botulinum toxins.

神経毒素活性を持つ他のA、B、E毒素がこのADPリボシル化活性を示さないことから(Fig. 2)、この酵素活性はC₁やD毒素固有の作用であり、神経毒素作用を持つ全てのボツリヌス毒素に共通の機構ではないことがわかった。後に、C₁やD型ボツリヌス菌の培養濾液中に神経毒素作用を持たない分子量25,000のC₃酵素と呼ばれる蛋白質の存在が明らかにされ[10]、この酵素がC₁やD毒素でADPリボシル化される分子量22,000の蛋白質と同一の分子量と等電点を持つ蛋白質をADPリボシル化することが証明された[12,13]。このC₃酵素によるADPリボシル化活性はC₁やD毒素の有する酵素活性よりも約1,000倍強く、しかもC₁やD毒素の精製において微量に混在するC₃酵素を完全に除去する工夫を行なうとC₁やD毒素の有するADPリボシル化活性が減弱あるいは消失することから、C₁やD毒素の有するADPリボシル化活性はC₁やD毒素内に微量に混在するC₃酵素によることが示唆された[12]。さらに、Adam-Viziらは、ボツリヌスD毒素をクロマフィン細胞とともにインキュベートするとカテコールアミン遊離抑制作用と細胞内蛋白質のADPリボシル化が同時に観察されるが、この時に神経毒素作用のないC₃酵素の特異抗体を処理しておく、細胞内蛋白質のADPリボシル化のみが阻害され、カテコールアミン遊離抑制作用は阻害されないことを報告した[14]。これらの報告より、この毒素の有するADPリボシル化活性はC₃酵素によるもので、ボツリヌス神経毒性発現機序ではないことが明らかにされた。

それでは、ボツリヌスADPリボシル化酵素によって修飾される蛋白質はどのような機能を持ち、また、この酵素により修飾された蛋白質は生理的に如何なる変化を受けるのであろうか？そこで、この標的蛋白質の特徴を知るために、現在までに報告されているADPリボシル化活性を有する毒素について調査してみると、Table 2に示すようにジフテリア毒素[15]や緑膿菌エキソトキシンA[16]はペプチド伸長因子2(EF-2)を、コレラ毒素[17-19]や大腸菌易熱性エンテロトキシン[20]はG_s、トランスジューシン(G_t)、翻訳開始因子(elf-2)を、百日咳毒素[21]はG_i、G_o、G_t、EF-2を特異的にADPリボシル化することがわかった。つまり、重鎖と軽鎖より構成される細菌毒素の一部はADPリボシル化活性を有

し、その標的蛋白質の多くはguanine nucleotide binding protein (以下、G蛋白質と略す) である。

Table 2 Natural distribution of mono ADP-ribosylation reactions

Enzyme (toxins)	Acceptor	
	Protein	Amino acid
Diphtheria toxin	elongation factor 2	diphthamide
Pseudomonas aeruginosa toxin A	elongation factor 2	diphthamide
Cholera toxin	Gs	arginine
	microtuble proteins	arginine
	transdusine	arginine
Escherichia coli enterotoxin LT	Gs	arginine
botulinum C2 toxin	cytoplasmic G actin	arginine
Pertussis toxin	Gi	cysteine
(Islet-activating protein)	transdusine	cysteine
	Go	cysteine
	elongation factor 2	cysteine

G 蛋白質は情報伝達系に關与し、種々のホルモン、神經伝達物質、オータコイドの細胞膜受容体とセカンドメセンジャーやイオンチャンネル間に介在して細胞外からもたらされる情報を細胞内情報に転換する役割を担っている。ここでは、G 蛋白質の一般的な概念を説明するために細胞膜受容体とアデニレートシクラーゼ間に介在する G_s と G_i について示した (Fig. 3)。ここに示した 2 つの G 蛋白質は早期に発見されたもので、 $\alpha\beta\gamma$ のヘテロ 3 量体構造より構成され、その α サブユニットには GDP が結合した形で受容体と共役していて、受容体はアゴニストに対して高親和状態が保たれていると想定されている。この受容体に細胞外からの情報すなわちアゴニストが結合すると、G 蛋白質の α サブユニットに結合している GDP が GTP に交換され、 $\beta\gamma$ サブユニットを解離し、同時にこの α サブユニットと受容体の会合が切断される。これが G 蛋白質としての活性化状態で、逆に受容体はアゴニストに対して低親和状態になる。この活性型 G 蛋白質が細胞膜受容体の認識した情報を下流にあるアデニレートシクラーゼに伝達する。例えば、 β -アドレナリン受容体のようにアデニレートシクラーゼを活性化する働きを持つ受容体は G_s (S=stimulate) [22,23] とカップルしていて、アゴニストの結合により cAMP を上昇させる。逆に、 α_2 -アドレナリン受容体のようにアデニレートシクラーゼを抑制する働きを持つ受容体は G_i (i=inhibitory) [24,25] とカップルしていて、アゴニストの結合により cAMP を低下させる。このようにして、この GTP 結合型 α サブユニットによって情報が cAMP のようなセカンドメッセンジャーに伝達されると、 α サブユニット自身が持つ GTP 水解活性 (以下、GTPase 活性と略す) によって GTP 結合型から GDP 結合型になり、再び $\beta\gamma$ サブユニットと受容体を会合してもとの状態に戻り、1 回の情報伝達を終了する。それ故、ある種の情報伝達系での G 蛋白質の關与を知るためには、GTP 細胞内投与によるセカンドメッセンジャーの活性化または抑制、それに伴う受容体とアゴニストの親和性の低下、受容体刺激に伴う GTPase 活性の上昇の有無等を検討すればよい。しかし、細胞膜受容体の違いにより連関する G 蛋白質も異なり、受容体によっては複数の異なる G 蛋白質が

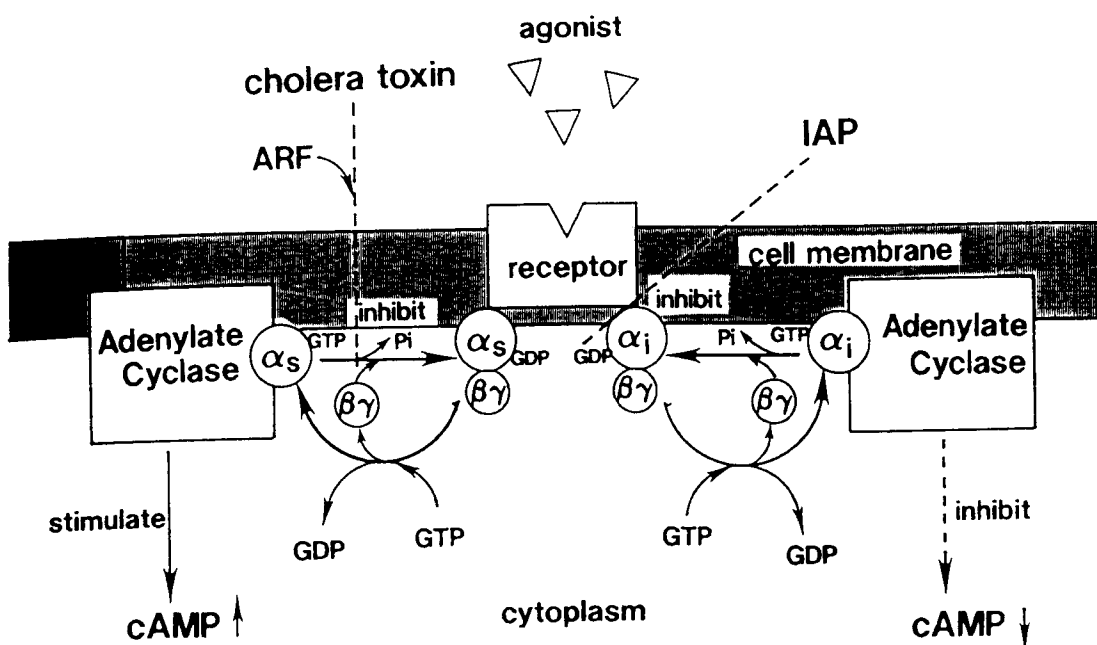


Fig. 3 Signal transduction of G_s and G_i.

介在する場合もあり、上記した方法だけではそのレセプターがどのG蛋白質と関連し、どのような情報伝達を調節しているのかを知ることが困難である。この問題解決に貢献したのが細菌毒素によるADPリボシル化反応である。例えば、コレラ毒素はG_sを特異的にADPリボシル化し、GTPase活性を抑制するため活性型G_s (α・GTP型) を維持し、G_sによる情報伝達を持続する[22,23]。一方、百日咳毒素はG_iを特異的にADPリボシル化し、レセプターとG_iの関連を阻害するためにG_iによる情報伝達を消失させる[24,25]。つまり、細菌毒素がそれぞれ固有のG蛋白質をADPリボシル化し、その機能を変化させること[4]を利用して、ある種の細胞膜レセプターと関連するG蛋白質やセカンドメッセンジャーの解明が成されてきた。このように、ADPリボシル化反応は特定のG蛋白質あるいはそのG蛋白質によって調節される情報伝達の解析のための重要なプローブの1つであり、さらに、新しいタイプのADPリボシル化酵素活性を明らかにすることは、未知の情報伝達系の解明に寄与すると考えられる。

ところで、これまでに報告されているヘテロ 3 量体 G 蛋白質やペプチド鎖伸長因子 (EF-1, 2)、翻訳開始因子 (eIF-2) の α サブユニットは分子量約 38,000 ~ 53,000 で、ボツリヌス ADP リボシル化酵素の標的蛋白質 (分子量 22,000) とは明らかに異なる。また、この蛋白質の分子量とほぼ同じ G 蛋白質としては、コレラ毒素による ADP リボシル化の補助因子である ARF (ADP-ribosylation factor) [26]、癌組織より発見された ras 蛋白質 [27]、 G_p [28] 等が知られているが、いずれの G 蛋白質ともボツリヌス ADP リボシル化酵素 (C_3 酵素あるいは C_1 、D 毒素) によって修飾されないことが報告されている [8]。これらのことから、ボツリヌス ADP リボシル化酵素の標的蛋白質は未知の G 蛋白質である可能性が考えられ、さらにこの基質蛋白質の機序を明らかにすることは先に述べたように新しい情報伝達機構の解明に寄与するものと予想される。そこで、著者らはこの標的蛋白質を単離精製を行ない、その性質を明らかにし (第 2 章)、その正体を明確にするために 1 次構造の決定を行なった (第 3 章)。また、この蛋白質の ADP リボース結合部位を決定し (第 4 章)、ボツリヌス ADP リボシル化がこの蛋白質の機能解明に寄与する重要な解析プローブであることを明らかにしたので報告する。

第2章 G_bの単離精製

ボツリヌスC₃酵素あるいはC₁、D型毒素でADPリボシル化される分子量22,000の蛋白質の単離精製を行なった。

1. ボツリヌスADPリボシル化酵素（以下、C₃酵素あるいはC₁、D毒素によるADPリボシル化酵素を示す）の基質蛋白質の組織分布

ラットを用いて、ボツリヌスADPリボシル化酵素の基質蛋白質の組織分布を調べた。Table 3に示すように、この基質蛋白質は脳や脊髄のような中枢神経系あるいは下垂体、副腎、腎臓、胸腺に多く、脾臓、膵臓、十二指腸、舌、心室、大動脈、心房および骨格筋に少ないことがわかった。また、この基質蛋白質は神経節、胃、唾液腺、肝臓、睾丸にも存在し、様々な組織に広く分布することがわかった。

2. G_b（ボツリヌスADPリボシル化酵素の基質蛋白質）の単離精製

分子量22,000のボツリヌスADPリボシル化酵素の基質蛋白質の精製は含有量の多いウシ副腎を用いて、その可溶性画分の硫酸塩析、DEAE-Sepharoseカラムクロマトグラフィー、Phenyl-Sepharoseカラムクロマトグラフィー、TSK-Gel G3000SWゲル濾過、Mono Q FPLCの順で精製した。この蛋白質は可溶性画分の硫酸塩析において、硫酸55%飽和に可溶で75%飽和で析出する画分（硫酸55~75%）に多く含有されることがわかった。この硫酸画分のDEAE-Sepharoseカラムクロマトグラフィーを行なうと、ボツリヌスADPリボシル化酵素の基質蛋白質は溶出時間の異なる2つのピークに分離され、溶出順にpeak1とpeak2と命名した(Fig. 4)。このpeak1およびpeak2を含有する画分を個別にボツリヌスC₁毒素を用いて [³²P]ADPリボシル化し、等電点電気泳動を行なったところ、Peak1とPeak2の等電点

Table 3 Tissue distribution of substrate for botulinum
ADP-ribosyltransferase

Source	Amount	Source	Amount
	pmol/mg of protein		pmol/mg of protein
Brain			
Olfactory	39.5	Pituitary	
Hypothalamus	38.1	Anterior	21.1
Striatum	33.7	Posterior	27.1
Septum	32.2		
Cerebral cortex	28.6	Adrenal	23.9
Cerebellum	28.0	Kidney	20.7
Hippocampus	27.7	Thymus	20.5
Thalamus	27.5	Stomach	15.7
Midbrain	27.1	Salivary gland	14.6
Pons-medulla	25.8	Liver	14.3
Spinal cord			
Cervical	37.7	Testis	11.9
Upper thoracic	25.6	Spleen	8.2
Lower thoracic	17.7	Pancreas	7.7
Lumbosacral	20.5	Jejunum	5.8
Ganglion			
Cervical	9.8	Tongue	4.9
Coeliac	3.4	Ventricle	3.9
		Aorta	3.1
		Atrium	2.8
		Skeletal muscle	Not detected

はそれぞれ5.9と6.1であった(Fig. 5)。また、両者の分子量は共に22,000であった。このPeak1をさらに精製するために、peak1画分のPhenyl-Sepharoseカラムクロマトグラフィーを行なうと、ボツリヌスADPリボシル化酵素の基質蛋白質は30%エチレングリコール/13%硫酸時に溶出され(Fig. 6)、さらに、この画分のTSK-gel 3000SWゲル濾過ではこの基質蛋白質の溶出時間は分子量約20,000の蛋白質の溶出時間と一致した(Fig. 7)。次に、このTSK-Gel G3000SWゲル濾過後の画分のMono Q FPLCを行なった結果、ADPリボシル化を受ける基質蛋白質はKCl濃度30mM付近に単一のピークとして溶出された(Fig. 8)。このMono Q FPLCにおける蛋白質溶出

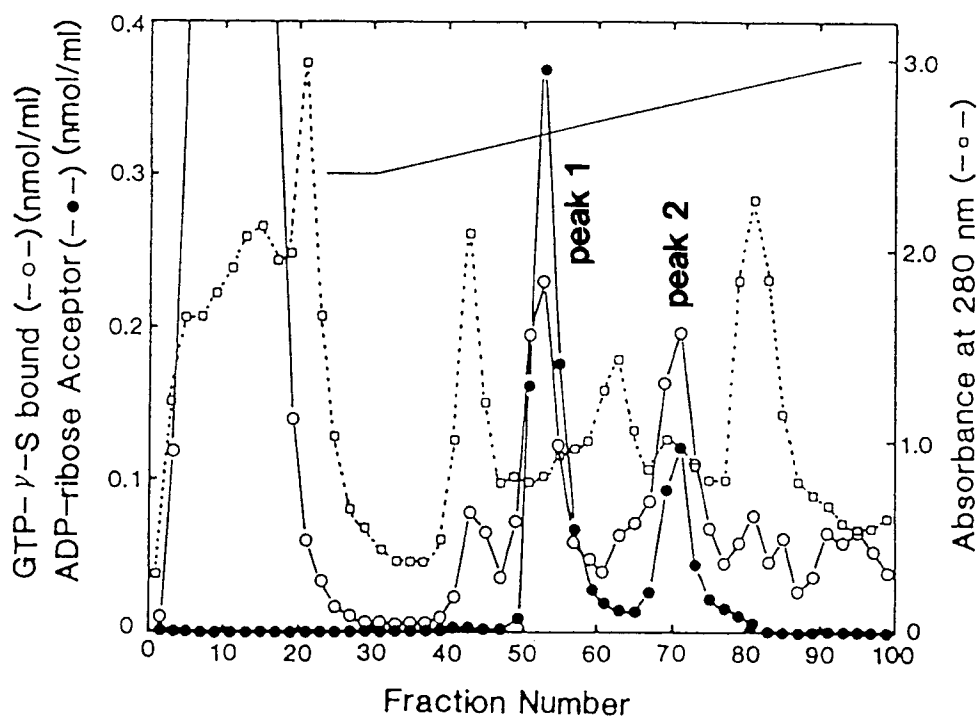


Fig. 4 DEAE-Sepharose column chromatography of the ammonium sulfate fraction. The column was eluted with a linear gradient of KCl at the concentration between 0 and 0.3M (straight line). Protein elution was monitored by absorbance at 280 nm (□). Aliquots, 50 and 30 μ l, of each fraction were used to determine the activities of the substrate for ADP-ribosylation (●) and GTP γ S binding (○).

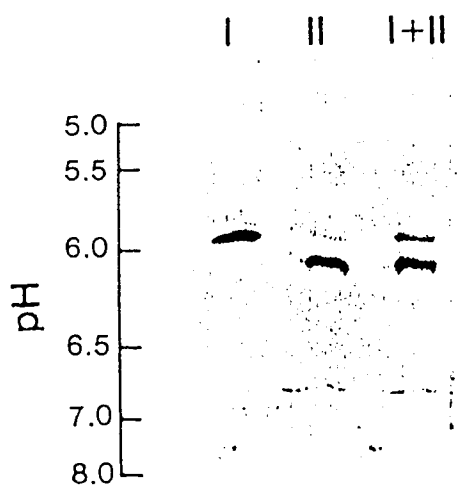


Fig. 5 Isoelectric focusing of the [^{32}P]ADP-ribosylated substrate in DEAE Peak 1 and 2 fractions. Peak 1 fraction (10 μg of protein) and Peak 2 fraction (27 μg of protein) from DEAE-Sephadex chromatography and mixture of peak 1 and 2 fraction (5 and 21 μg of protein, respectively) were incubated with the toxin and [^{32}P]NAD at 30°C for 2 h. After the reaction, the protein were preincubated and subjected to isoelectric focusing I, Peak 1 fraction ; II, Peak 2 fraction ; I+II, mixture of Peak 1 and 2 fractions.

パターンよりADPリボシル化基質蛋白質はほぼ均一にまで精製されたと予想されたので、この基質蛋白質を含有する画分の逆相系カラムHPLCとSDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動を実施した。その結果、HPLCにおいては分子量22,000の単一なピークのみが溶出され、SDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動においては分子量22,000の単一なバンドのみが確認された(Fig. 9)。以上より、この蛋白質は精製倍率1,779倍、回収率2.2%でほぼ均一にまで単離精製された(Table 4)。また、各精製段階のADPリボシル化基質を含有する画分は、全てGTPの非水解型であるGTP γ Sとの結合活性が強いことがわかった(Fig. 4,6-8)。

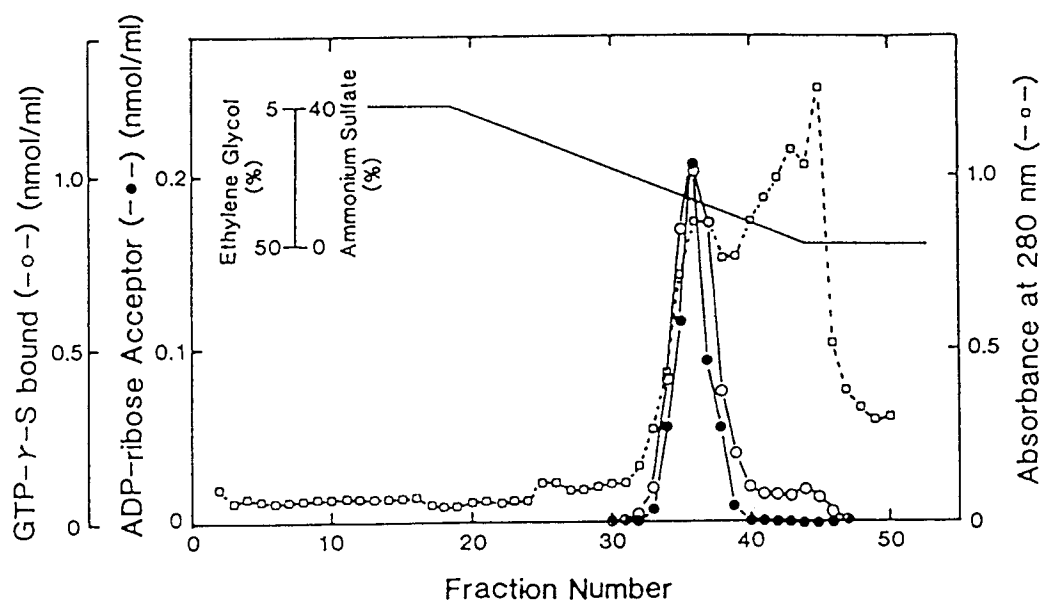


Fig. 6 Phenyl-Sepharose column chromatography of the DEAE Peak 1 fraction. Elution was performed by linear gradients of ammonium sulfate (40~0 %) and ethylene glycol (5~50 %) (straight line). Aliquots, 50 and 10 μ l, of each fraction were used to determine the activities of the substrate for ADP-ribosylation (●) and GTP γ S binding (○).

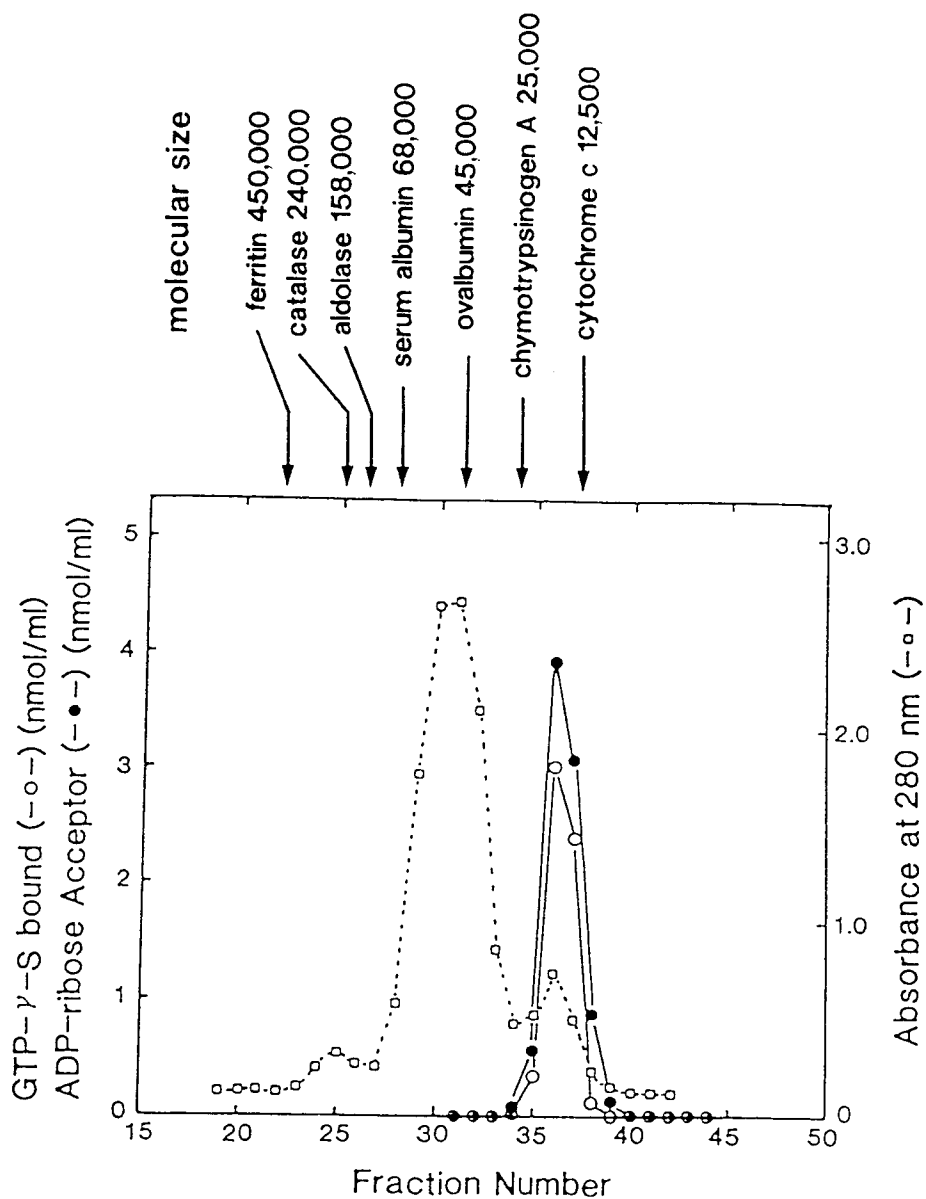


Fig. 7 Gel filtration of the Phenyl-Sepharose fraction on a TSK-gel G3000SW column. Aliquots, 10 μ l, of each fraction were used to determine the activities of the substrate for ADP-ribosylation (●) and GTP γ S binding (○).

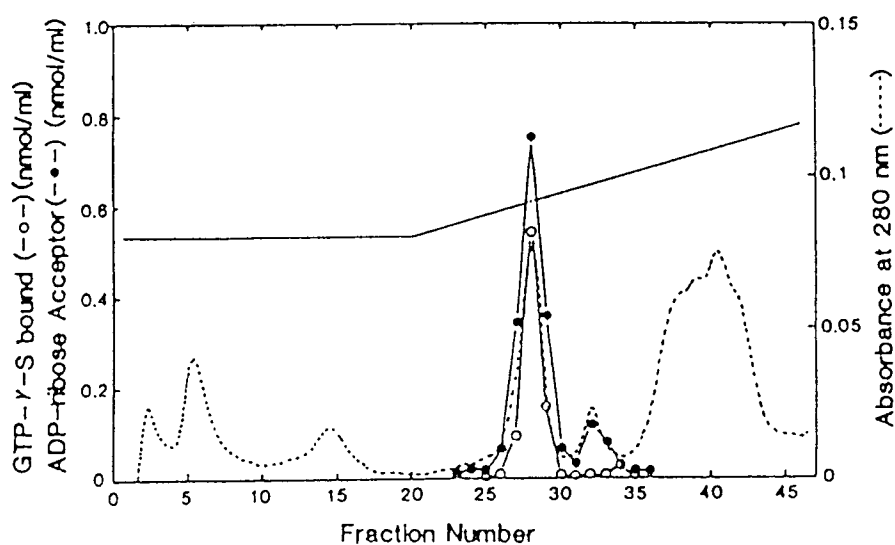


Fig. 8 Mono Q FPLC of the TSK-gel fraction. The column was eluted with a linear gradient between 0 and 0.3M KCl (straight line). Protein elution was monitored by absorbance at 280 nm (dotted line). Aliquots, 10 μ l, of each fraction were used to determined the activities of the substrate for ADP-ribosylation (●) and GTP γ S binding (○). GDP was eluted around fraction No.40. Elution profile between 0 and 0.1 M KCl gradient is shown.

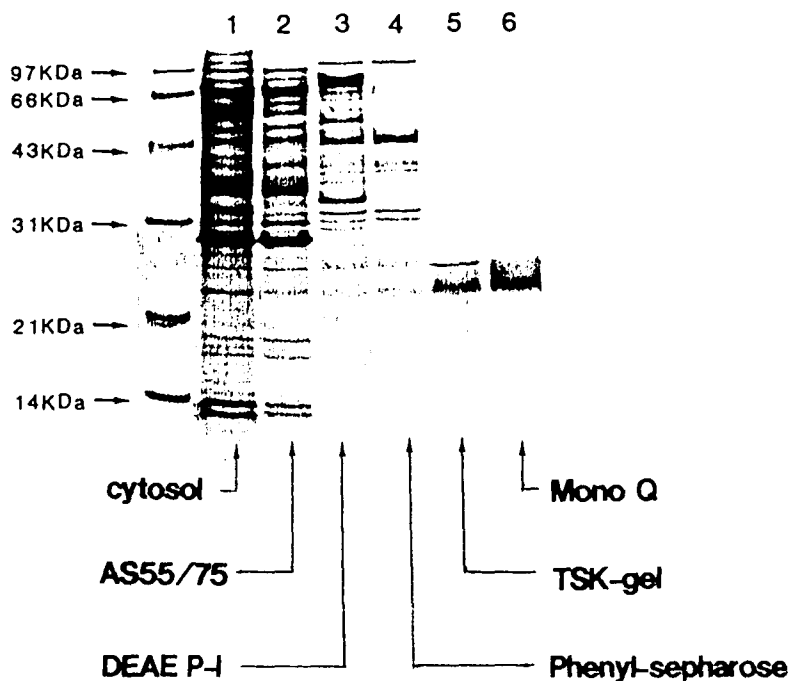


Fig. 9 SDS-polyacrylamide gel electrophoresis of the different preparations of the cytosolic substrate for botulinum ADP-ribosyltransferase.

Samples from each step of purification were subjected to SDS-polyacrylamide gel electrophoresis which was run at a constant current of 35 mA. Proteins were stained with Coomassie Brilliant Blue R-250 in 50 % methanol containing 10 % acetic acid. The left lane shows calibration proteins with their molecular weights. Lane 1, the cytosol, 60 μ g ; lane 2, the ammonium sulfate fraction, 40 μ g ; lane 3, the DEAE-Sepharose Peak 1 fraction, 20 μ g ; lane 4, the phenyl-Sepharose fraction, 10 μ g ; lane 5, the TSK-gel fraction, 4 μ g ; lane 6, the Mono Q fraction, 8 μ g.

Table 4 Purification the substrate for botulinum ADP-ribosyltransferase from bovine adrenal gland.

Step	ADP-ribosylation			Purification	Recovery
	Protein	substrate			
		Amount	Specific		
			activity		
	mg	nmol	nmol/mg	-fold	%
Cytosol	5,558	107	0.019	1	100
Ammonium sulfate	1,724	48.2	0.028	1.5	45
DEAE-Sepharose					
Peak 1	66.3	19.1	0.288	15	17.8
Peak 2	59.2	5.6	0.095	5	5.2
Phenyl-Sepharose	12.4	9.62	0.788	41	9.0
TSK-gel	0.44	4.04	9.10	479	3.8
Mono Q	0.07	2.40	33.8	1,779	2.2

3. G_b (ボツリヌスADPリボシル化酵素の基質蛋白質) の性質について

この精製標品を用いて数種のヌクレオチドとの結合実験を行なった。この基質蛋白質はGTPやGDPと特異的に結合し、GMP、ATPあるいはADPとの結合が弱く(Fig. 10)、この蛋白質がG蛋白質としての特徴を示すことがわかった。そこで、この基質蛋白質をボツリヌスADPリボシル化酵素で修飾されるG蛋白質ということから、 G_b (b=botulinum) と命名した。

G_b とGTPの非水解型であるGTP γ Sとの結合反応のタイムコースを調べると、Phenyl-SepharoseカラムクロマトグラフィーやTSK-Gel G3000SWゲル濾過後の部分精製した G_b の最大反応到達時間は3時間で、精製 G_b のそれは8~12時間であった(Fig. 11A)。そこで、反応時間を12時間として、CBB(Coomassie Brilliant Blue G250)蛋白質定量より求めた精製 G_b 量に対するGTP γ S結合量を調べた結果、この反応には用量依存性が観察され、精製 G_b 1molあたりGTP γ Sは最大0.5molまで結合することがわかった(Fig. 11B)。また、精製 G_b のADPリボシル化反応は2時間で最大反応に到達し(Fig. 12B)、この反応時間を用いた時の G_b 量とADPリボースとの結合比を求めると、精製 G_b 1molあたり最大0.7molまでADPリボースが結合することがわかった(Fig. 12A)。この時、ADPリボースの結合反応は G_b の用量に依存していることがわかった。以上の結果より、 G_b は1分子あたり1ヶ所のADPリボース結合部位を持つ分子量22,000のG蛋白質であることが示唆された。

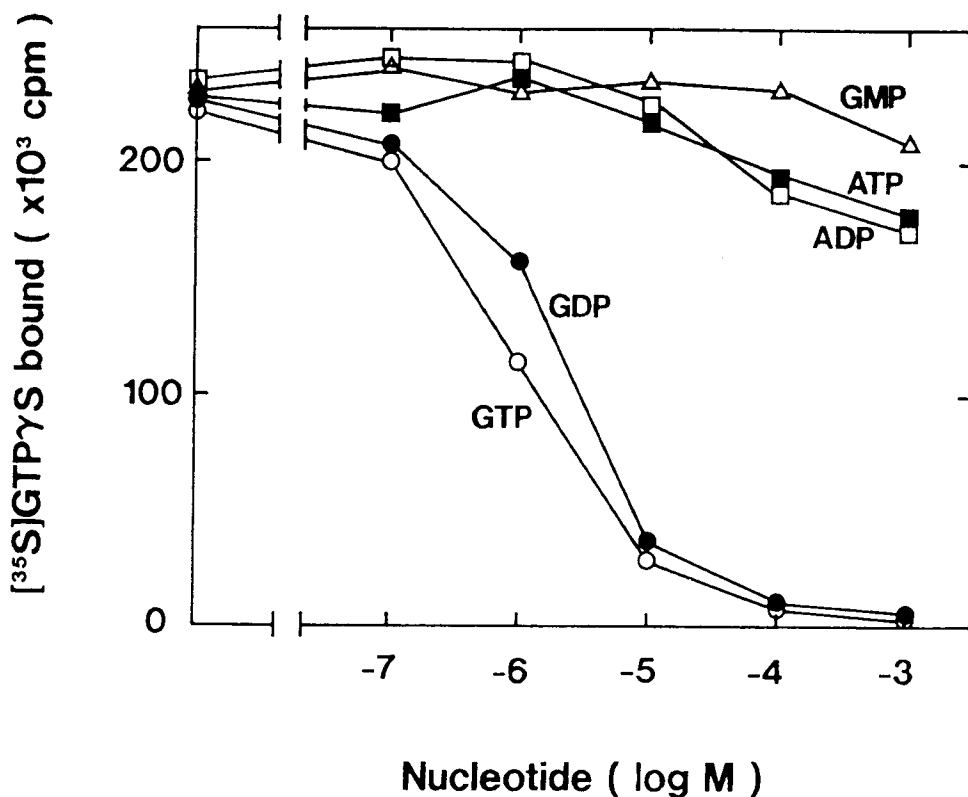


Fig. 10 Competition by various nucleotides for $[^{35}\text{S}]\text{GTP}\gamma\text{S}$ binding to the purified protein (Gb). The purified protein, Gb, $0.3 \mu\text{g}$, was incubated with $[^{35}\text{S}]\text{GTP}\gamma\text{S}$ ($60,000 \text{ cpm/pmol}$) in the presence of indicated concentrations of various nucleotides for 1.5 h at 30°C as described under "Methods." Nucleotides used are GTP (○), GDP (●), GMP (△), ATP (■), and ADP (□).

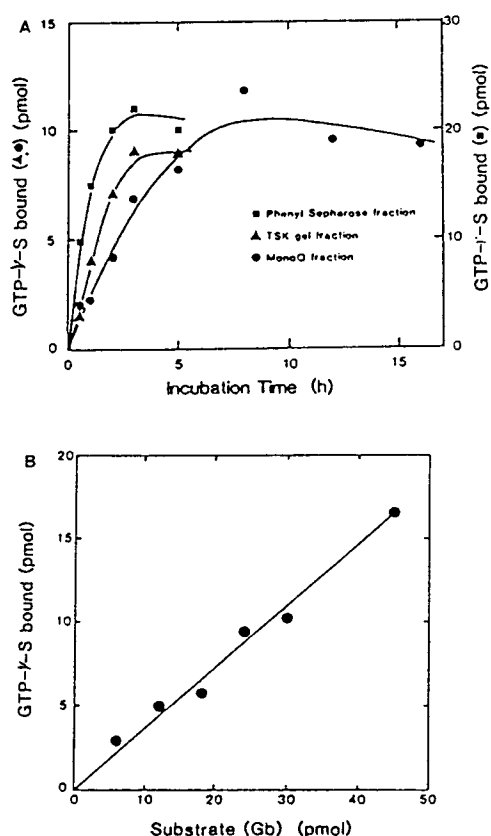


Fig. 11 Characteristics of GTP γ S binding to the purified protein.

A, time course of GTP γ S binding to the phenyl-Sepharose fraction ($15 \mu\text{g}$ of protein) (■), the TSK-Gel fraction ($1.5 \mu\text{g}$) (▲), and the Mono Q fraction ($0.7 \mu\text{g}$) (●). Reaction was carried out for the indicated times and [^{35}S]GTP γ S binding was determined as described under "Methods." B, GTP γ S binding as a function of amount of Gb. Various amounts of the purified protein (the Mono Q fraction) were incubated with [^{35}S]GTP γ S for 12h at 30°C and binding was determined as described under "Methods."

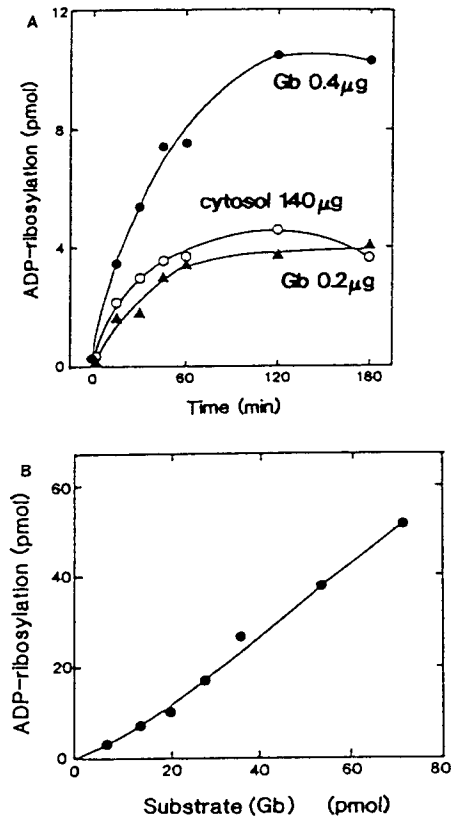


Fig. 12 Characteristics of ADP-ribosylation of the purified protein by botulinum ADP-ribosyltransferase. A, time course of ADP-ribosylation. The purified protein (Gb), 0.2 μ g (\blacktriangle) and 0.4 μ g (\bullet), and the cytosol, 140 μ g (\circ), were incubated with toxin and $[^{32}\text{P}]\text{NAD}$ at 30°C for the incubated times. ADP-ribosylation of the substrate was determined as described under "Methods." B, incorporation of $[^{32}\text{P}]\text{ADP-ribose}$ as a function of the purified protein amounts. Various amounts of the purified protein were incubated with the toxin and $[^{32}\text{P}]\text{NAD}$ at 30°C for 2h and incorporation of the radioactivity was determined as described under "Methods." Amounts (in picomoles) of the purified protein were calculated assuming its molecular weight of 22,000.

4. 考察

ボツリヌスC₁およびD毒素(C₃酵素)によってADPリボシル化を受ける蛋白質の細胞内機能を明かにするために精製に着手し、この基質蛋白質をウシ可溶性画分より精製倍率1,779倍、回収率2.2%で単離精製することに成功した。各精製段階でのボツリヌスC₁毒素でADPリボシル化を受ける画分はいずれもGTP γ S結合活性が高く、また、単離精製したADPリボシル化酵素基質蛋白質ではGTPやGDPと特異的に結合し、GMP、ATP、ADPとの結合が弱いことから、この基質蛋白質がG蛋白質であることを証明した。理論的にはG蛋白質の大部分はGDPかあるいはGTPと結合していると考えられるので、GTPの非水解型であるGTP γ Sを用いることによってG_b 1分子に対してほぼ1分子のGTP γ Sを結合することができるはずであるが、実際にはG_bとGTP γ Sとの結合比は0.5mol・GTP γ S/mol・G_bであり、その結合最大値が低い。さらに、Phenyl-Sepharoseカラムクロマトグラフィー後やTSK-Gel G3000SWゲル濾過後の部分精製したG_bではGTP γ S結合の最大反応到達時間が約3時間であるのに対し、Mono Q FPLC後の単離精製されたG_bではそれが約8~12時間に変化する。この原因には2つの可能性が考えられ、1つは最終精製段階のMono Q FPLCにおいて、G_b溶出時の緩衝液中からこの蛋白質の安定化に働くGDPが分離(GDPはMono Q FPLCに結合し、G_bの溶出時と異なる時間に溶出される)されて一部が失活した可能性で、もう1つの可能性はG_bを単離精製することによってGDPからGTPへの交換反応を促進するような因子が分離したため、GTP(GTP γ S)結合反応が不十分となった可能性である。

ところで、これまでに報告されているADPリボシル化反応には基質となる蛋白質1分子に対して1分子のADPリボースが結合する反応と、何分子かのADPリボースが結合する反応の2つのタイプが知られていて、前者はモノ(ADP)リボシル化、後者はポリ(ADP)リボシル化と呼ばれている[4]。精製G_bに対するADPリボシル化反応は、G_b 1molにADPリボースが最大0.7molまで結合できることから、モノ(ADP)リボシル化反応のタイプに属すると考えられ、

G_bの分子中に1ヶ所のモノマーのADPリボース結合部位を持つことが示唆された。このことは、これまでに報告されている細菌毒素によるG蛋白質のADPリボシル化がモノ(ADP)リボシル化であることと一致した。

一方、このボツリヌスADPリボシル化酵素の基質となるG蛋白質は膜分画および細胞質画分のいずれにも存在し[29]、また、種々の組織に広域に分布する。さらに、G_sやG_iのようなヘテロ3量体のG蛋白質に比較して低分子量であり、精製段階においても付随するβγサブユニットは検出されなかった。また、この基質蛋白質には等電点の異なるヘテロ体が存在する。これらの特徴は癌遺伝子として知られているras p21(rat sarcoma)と類似している。しかし、ボツリヌスC₁およびD毒素がN-、v-ki-あるいはHa-ras p21をADPリボシル化できないことやN-rasのポリクローナル抗体がこのADPリボシル化基質を免疫沈降しないこと[11]、同様にras p21と免疫沈降できるモノクローナル抗体のY-13-259[30]によってこの基質蛋白質が免疫沈降出来ないこと[Ohashi and Narumiya, unpublished observation]等から、このADPリボシル化基質蛋白質はras p21とは異なる蛋白質であることが既に明らかにされている。また、この基質蛋白質は同分子量のG蛋白質であるARFやG_pとも異なることから[8]、このボツリヌスADPリボシル化酵素で修飾される分子量22,000のG蛋白質をG_b(b=botulinum)と命名した。G_bは新規なG蛋白質である可能性があり、この酵素反応はG_bの調節する情報伝達を明らかにする上で有力な手段になるものと想定され、未知の情報伝達系の解明に寄与する可能性がある。そのためには、まずこの蛋白質の1次構造を明らかにする必要がある。

実験の部 (1)

1) 試薬

[α - 32 P]NAD(34 Ci/mmol)と[γ - 35 S]GTP γ S(1350 Ci/mmol)はDu Pont-New England Nuclearより購入した。Botulinum type C₁ toxin (L form)は大阪府立大学の阪口玄二教授より供与を受けた。DEAE-Sepharose CL-6B、Phenyl-Sepharose CL-4B、MonoQ HR5/5 columnはPharmacia LKB Biotechnology Inc.より、TSK-Gel G3000SW columnはtosohより購入した。ADP、ATP、GDP、NADとphenylmethylsulfonyl fluorideはSigmaより、benzamidinium hydrochloride、dithiothreitol、EDTA \cdot 2Na、trifluoroacetic acidはNakarai Tesque, Inc., Kyoto, Japan.より、GTPはYamasa Syoyu Ltd., Chiba, Japanより、GTP γ SはBoehringer-Mannheim GmbH West Germanyより、GMPはKohjin, Tokyo, Japanよりそれぞれ購入した。SDS-PAGE molecular weight standardsはBio-Radより、gel filtration molecular weight standardsはBoehringer-Mannheim GmbH, West GermanyよりampholineはLKBよりそれぞれ購入した。

2) ボツリヌスADPリボシル化酵素の基質蛋白質の組織分布

体重180-200gの雄性Wistar系ラットを4匹用いて、麻酔後、瀉血して殺し、素早く各組織（脳、脊髄、神経節、下垂体、副腎、腎臓、胸腺、胃、顎下腺、肝臓、睾丸、脾臓、膵臓、十二指腸、舌、心室、大動脈、心房、骨格筋）を摘出し、液体窒素にて凍結した。この時、脳はGlowinski and Iversen[31]の方法を改良し[32]、10の部分に分離した。この凍結組織はその重量を測定し、その3倍量のhomogenizing buffer(20mM Tris \cdot HCl, pH7.5, 5mM MgCl₂, 1mM dithiothreitol, 1mM EDTA, 2mM benzamidinium hydrochloride, 0.43mM phenylmethylsulfonyl fluoride, 0.25M sucrose)中でポリトロンにてホモジナイズした。これを1,000 x gで15分間遠心分離し、その上清を用いて以下に示す方法でADPリボシル化される蛋白質を定量し、mg蛋白質当りのADPリボシル化基質蛋白質含量を求めた。

3) ADPリボシル化反応

実験は、Ohashiらの方法に従って行なった[8]。Fig. 13に示すように、各精製段階の標本を、 $50\mu\text{M}$ $[^{32}\text{P}]\text{NAD}$ (900cpm/pmol)と $5\mu\text{g}$ ボツリヌス C_1 毒素を含むADP-ribosylation assay mixture(100mM Tris·HCl, pH8.0, 10mM thymidine, 10mM dithiothreitol, 10mM nicotinamide, 5mM MgCl_2)中で、全量 $100\mu\text{l}$ に調製して反応を開始した。反応は 30°C 下で3時間行ない、 0.02% コール酸ナトリウム $400\mu\text{l}$ および 24% トリクロロ酢酸 $200\mu\text{l}$ を添加して反応を停止させた。これを氷冷下で20分間放置して蛋白質を析出させた後[33]、 4°C 、 $10,000\times g$ 、20分間の遠心分離にてその沈澱を得た。この沈澱を、 $40\mu\text{l}$ のLaemmli sample bufferに溶解し、 15% SDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動を行なった[34]。このゲルはCoomassie Brilliant Blue R-250にて染色し、乾燥後、分子量22,000付近の放射活性をトルエンシンチレーター中で液体シンチレーションカウンター(Packard Minaxi model 4530)にて測定した。

4) グアニンヌクレオチド結合実験

実験はNorthupらの方法[35]に従って行なった。Fig. 14に示すように、各精製段階の標本を、 $1\mu\text{M}$ $[^{35}\text{S}]\text{GTP}\gamma\text{S}$ (20 Ci/mmol)を含むGTP γS binding assay mixture(20mM Tris·HCl, pH8.0, 100mM NaCl, 30mM MgCl_2 , 1mM EDTA, 5mM dithiothreitol)中で、全量 $50\mu\text{l}$ に調製して反応を開始した。反応は 30°C で2時間行なった後、2mlの氷冷したWashing Buffer(20mM Tris·HCl, pH8.0, 100mM NaCl, 25mM MgCl_2 , 0.1mM GTP)を添加して反応を停止させ、BA85メンブランフィルター(Schleicher & Shuell)を用いてフィルターアッセイを行なった。このフィルターは、3mlのWashing bufferにて5回洗浄後、乾燥し、このフィルターに結合する $[^{35}\text{S}]\text{GTP}\gamma\text{S}$ 結合型 G_b の放射活性を測定した。

ADP-ribosylation assay mixture	40 μ l
(100mM Tris · HCl, pH8.0, 10mM thymidine, 10mM dithiothreitol, 10mM nicotinamide, 5mM MgCl ₂)	
Gb (~40 pmol)	X μ l
H ₂ O	53.5-X μ l
[³² P]NAD (30 Ci/mmol, 2 mCi/ml)	1 μ l
10 mM NAD	0.5 μ l
1 mg/ml botulinum type C ₁ -L-toxin	5 μ l

100 μ l



Incubated at 30°C for 3h



The reaction was terminated (+ 0.02% sodium deoxycholate 400 μ l
and 24% trichloroacetic acid 200 μ l)



Chilled on ice for 20 min and then centrifuged at 4°C at 10,000 x g
for 20min



The precipitates recovered were dissolved in 40 μ l of
Laemmli sample buffer



15% SDS-polyacrylamide gel electrophoresis



Stained with Coomassie Brilliant Blue R-250



The radioactive bands corresponding to Mw 22,000 substrate
were excised and the radioactivity was measured

Fig. 13 ADP-ribosylation assay.

GTP γ S binding assay mixture	5 μ l
(20mM Tris \cdot HCl, pH8.0, 100mM NaCl, 30mM MgCl ₂ , 1mM EDTA, 5 mM dithiothreitol)	
10mM Dithiothreitol	5 μ l
100 μ M GTP γ S	0.5 μ l
[³⁵ S]GTP γ S (1,350 Ci/mmol, 10.3 Ci/ml)	0.1 μ l
Gb (\sim 75 pmol)	X μ l
H ₂ O	39.4-X μ l
<hr/>	
	50 μ l

▼
Incubated at 30°C for 2h

▼
The reaction was quenched by the addition of 2 ml
of ice cold Washing buffer (20mM Tris \cdot HCl, pH8.0,
100mM NaCl, 25mM MgCl₂, 0.1mM GTP)

▼
Filtered under vacuum through a BA-85 membrane
(Washed five times with 3 ml of the Washing buffer)

▼
The filter-bound radioactivity was determined

Fig. 14 [³⁵S]GTP γ S binding assay.

5) 各種ヌクレオチドとの結合実験

実験4)の方法を用いて、 G_b の $[^{35}\text{S}]\text{GTP}\gamma\text{S}$ 結合に対する各種ヌクレオチドによる結合阻害活性(ディスプレースメントカーブ)を求めた。

方法はCBB定量法により求めた G_b $0.3\mu\text{g}$ を $0.1\times 10^{-7}\sim 1\times 10^{-3}\text{M}$ (10倍公比)のGTP、GDP、GMP、ATPあるいはADP存在下で $[^{35}\text{S}]\text{GTP}\gamma\text{S}$ (60,000cpm/pmol)とともにGTP γS assay mixture中で 30°C 、1.5時間インキュベートを行なった。反応後、 G_b に結合する $[^{35}\text{S}]\text{GTP}\gamma\text{S}$ 量をフィルターアッセイによって求めた。

6) 二次元電気泳動

部分精製した G_b を含有するDEAE peak1とDEAE peak2(Fig. 4)フラクションに24%トリクロロ酢酸を $400\mu\text{l}$ 添加し、得られた蛋白質沈澱を 1ml のジエチルエーテルで洗浄後、できるだけ少量の8M urea, 2% Nonidet P-40, 5% β -mercapto-ethanol, 2% Ampholine溶液に溶解させた。AmpholineはAmpholine pH3.5-10とpH 5-7試薬を1:4に混合したものを使用した。方法はO'Farrelの方法[36]に従い、LKB2117 Multiphorシステムを用いて、一次元目に等電点電気泳動を[37]、二次元目にLaemmliの不連続緩衝液系SDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動を行なった。

7) G_b 精製法

①可溶性画分の硫安分画の作製

精製はウシ副腎を用いて行なった。摘出直後に -80°C 以下で凍結保存した標本 212g をハサミで細分し、切片をその3倍量(640ml)のhomogenizing buffer(20mM Tris·HCl, pH 7.5, 5mM MgCl_2 , 1mM dithiothreitol, 1mM EDTA, 2mM benzamidine hydrochloride, 0.43mM phenylmethylsulfonyl fluoride, 0.25M sucrose)中でワーリングブレンダーにて2,500rpm, 2.5分間で組織を粉碎した後、Potter-Elvehjem homogenizerで3ストロークしてホモジネートを作製した。そのホモジネートを $10,000\times g$ で20分間遠心し、その上清をさらに $100,000\times g$ で1時間遠心分離してその上清 570ml を可溶性画分(cytosol)とした。これを泡立てないように

に攪拌しながら乳鉢中でよく粉碎した硫安を55%飽和（100mlサンプルに対して32.6g硫安）になるまで少量ずつ添加し、4°Cで1時間攪拌して、10,000 x gで20分間遠心分離を行なった。その上清にさらに75%飽和になるように硫安（100mlサンプルに対して12.7g硫安）を追加して再び4°C下で1時間攪拌し、10,000 x gで20分間の遠心分離後、その沈澱（硫安55~75%画分）を得た。これをTMDEGE buffer（20mM Tris・HCl, pH7.5, 5mM MgCl₂, 1mM dithiothreitol, 1mM EDTA, 1μM GDP, 5% ethylene glycol）150mlに静かに溶解させ、同組成のbuffer中で一晚透析して硫安除去を行なった。硫安除去はTMDEGE bufferと透析サンプルの電導度が一致することで確認した。この透析後のサンプル量は206mlであった。

②DEAE-Sepharose カラムクロマトグラフィー

①で得られた硫安55~75%画分をDEAE buffer（20mM Tris・HCl, pH7.5, 5mM MgCl₂, 1mM dithiothreitol, 1mM EDTA, 5% ethylene glycol）で平衡化したDEAE-Sepharose（直径 2.5cm x高さ 20cm）カラムに吸着させた。吸着後のカラムは280nmの吸収が0.4以下になるまでDEAE bufferで洗浄した後、カラムに結合した蛋白質を0~0.3M KClのlinear gradientで溶出した。このグラジエントの全液量は1300ml、溶出液は13 mlずつ採取し、各フラクションのADPリボシル化活性とGTPγS結合活性を調べた。ボツリヌスADPリボシル化酵素の基質蛋白質は0.1と0.2M KCl濃度時付近に溶出され、両画分とも強いGTPγS結合活性を有していた。これらを溶出順にpeak1, peak2と命名した（Fig. 4）。以下、このpeak1（106ml）の精製を行なった。蛋白質の溶出パターンは280nmの吸光度下にてモニターし、実験は全て4°C下で行ない、サンプル保存は氷冷下とした。この操作は以下の精製において同様に行なった。

③Phenyl-Sepharose カラムクロマトグラフィー

DEAE-Sepharoseで得たpeak 1画分（106ml）に蛋白質が析出しないように注意しながら硫安24g（40%飽和）を少量ずつ添加した後、硫安40%飽和（100ml bufferあた

り22.7g硫安添加)のTMDEGE bufferで平衡化したPhenyl-Sepharose(直径1.5cmx高さ5.7cm)カラムに吸着させた。このカラムは280nmの吸光度が0.1以下になるまで上記平衡化bufferにて洗浄した後、硫安濃度が40%~0%で同時にエチレングリコール濃度が5%~50%になるようなlinear gradientで吸着した蛋白質を溶出させた。この時、グラジエントの全量は140mlで、溶出液は5.7mlずつ採取し、各フラクションのADPリボシル化活性ならびにGTP γ S結合活性を測定した。ボツリヌスADPリボシル化酵素の基質蛋白質は硫安13%/エチレングリコール30%時に溶出され(Fig. 6)、GTP γ S結合活性を有していた。このピークの全量は23mlであった(Phenyl-Sepharose画分とする)。これをDiaflo PM-10(amicon)およびCentricon 10(amicon)を用いて0.5M KClを含むTMDEGE bufferに置換し、最終容量が220 μ lになるまで濃縮した。

④TSK-Gel G3000SWゲル濾過

FPLC システム(Pharmacia LKB Biotechnology Inc.)に接続したTSK-Gel G3000 SWカラムを用いてPhenyl-Sepharose画分をゲル濾過した。ゲル濾過は0.5M KClを含むTMDEGE bufferにて行ない、この時、流速は0.3ml/min、溶出液は0.6mlずつ採取した。ボツリヌスADPリボシル化酵素の基質蛋白質は、分子量約20,000の蛋白質の溶出時付近に溶出され、GTP γ S結合活性を有していた。全量は1.2mlであった(Fig. 7)。このサンプルはCentricon 10を用いて濃縮とTMDEGE buffer添加を繰り返してサンプル中に含まれる0.5M KClを除去し、440 μ lまで濃縮した。

⑤Mono Q FPLC カラムクロマトグラフィー

④で得られたサンプルをTMDEGE bufferで平衡化したMono Q FPLCに吸着させ、同buffer 12mlでカラム洗浄した後、流速0.6ml/minで0~0.3M KClのlinear gradientで吸着蛋白質を溶出させた。この時、グラジエントの全量は60mlで、溶出液は0.6 mlずつ採取した。ボツリヌスADPリボシル化酵素の基質蛋白質は、0.03M KCl濃度時に単一なピークとして溶出され(Fig. 8)、このピークはGTP γ S結

合活性を有していた。

8) 蛋白定量法

定量は、Bradfordの方法[38]に従って行なった。蛋白質染色は、Coomassie Brilliant Blue G-250で行ない、蛋白質定量のための検量線はウシ血清アルブミンを用いて求めた。

第 3 章 G_b蛋白質の同定

前章で、ボツリヌスADPリボシル化酵素で修飾される分子量22,000のG蛋白質を単離精製し、G_bと命名した。このG_bの詳細についてさらに明らかにするために、その1次構造の決定を行なった。

1. G_bの同定

ウシ副腎より精製したG_bのアミノ酸配列を知るために精製G_bを直接プロテインシーケンサー（自動エドマン分解法）にて解析したが、その一次構造は決定できなかった。この原因は、G_bのアミノ末端が何等かの修飾を受けているためと予想される。そこで、精製したG_bを数種のプロテアーゼで消化し、HPLC(high performance liquid chromatography)で分離して得られた部分ペプチドのアミノ酸配列の決定を試みた。精製G_bをその1/100(mol/mol)量のトリプシンにて消化し、このサンプル中に含まれる部分ペプチドのHPLCによる分離を行なうと、9つのsingle peakに分離された(Fig. 15A)。これらの画分に含まれる部分ペプチドのアミノ酸配列の解析を行なった結果、peak1,3,4,5,6,7,8の7つの画分はそれぞれ1部分ペプチドより構成されていたのでそれらのアミノ酸配列を決定することができた(Table 5)。また、peak2,9の解析においては2つ以上の異なるペプチドが混在していたためにそのアミノ酸配列の決定ができなかった。これとは別に用意した精製G_bをその1/50(mol/mol)量のトリプシンで消化し、得られた11のsingle peak(Fig. 15B)の解析では、peak1,2,3,4,6,7,11の7つのピークが均一な部分ペプチドとしてアミノ酸配列が決定できた(Table 5)。また、peak5,8,9,10は2つ以上の異なるペプチドが混在していた。そこで、peak9をプロテアーゼV8にてさらに消化し、HPLCの分離によって得られた部分ペプチドの解析を行なった結果、1部分ペプチドの配列を決定することができた(Table 5)。また、別に用意したG_bのリシルエン

ドペプチダーゼ (Lysyl endopeptidase) 消化により1部分ペプチドのアミノ酸配列を決定した (Table 5)。以上の実験より、互いに共通構造を持つ16部分ペプチドのアミノ酸配列が決定され、105のアミノ酸配列が確認された。これらの部分ペプチドのアミノ酸配列についてホモロジー検索を行なったところ、いずれもアメフラシの rho 遺伝子産物と高い相同性を示し、105のアミノ酸のうち89のアミノ酸配列が一致し、12のアミノ酸残基が異なり、4アミノ酸残基が検出されなかった (Fig. 16)。また、ヒトT細胞よりクローニングされた rho A 遺伝子産物とほぼ完全に一致した。以上の結果より、G_bは rho 遺伝子産物であることが示唆され、rho 遺伝子産物が A D P リボシル化されることを初めて確認することができた。

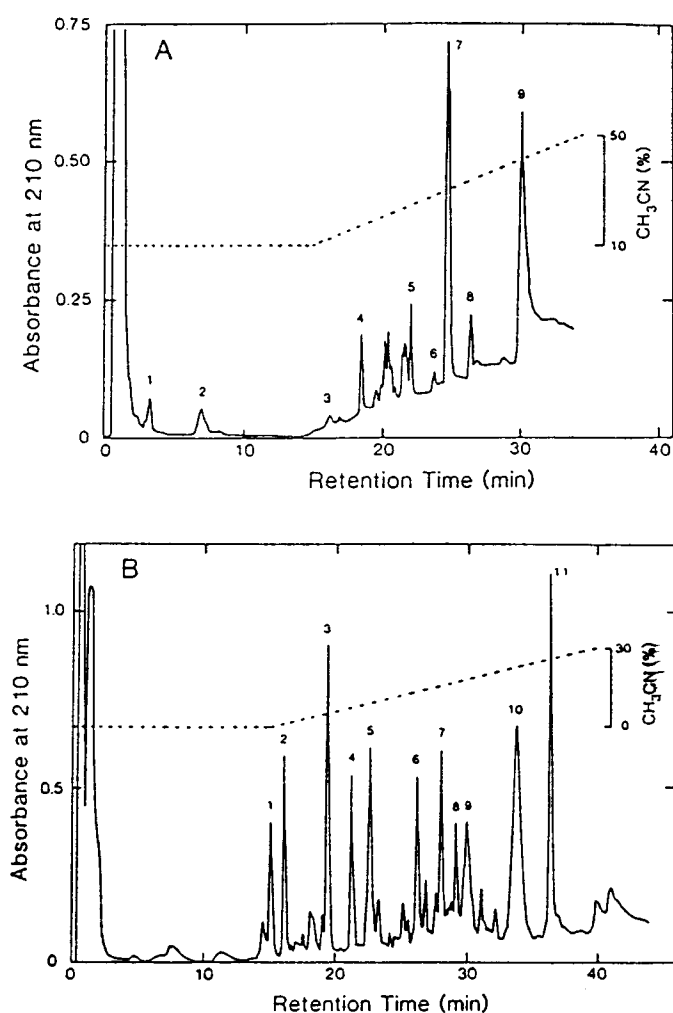


Fig. 15 HPLC of the first(A) and second(B) tryptic digests of Gb. Purified Gb was digested with trypsin, and the digestion products were applied to a reversed phase HPLC as described under "Methods." Peaks numbered in the figure were subjected to the amino acid sequence analysis by a protein sequenator. A broken line represents the acetonitrile gradient corrected for the dead space of HPLC pump. Elution profiles up to 50%(A) and 30%(B) acetonitrile concentrations are shown.

Table 5 Amino acid sequences of the proteolytic peptides

Proteolytic fragments of Gb were separated, and their amino acid sequences were determined as described under "Methods." Try(1), Try(2), V8, and Lys indicate fragments obtained from first and second digestion with trypsin, and digestion with protease V8 and Lysyl endopeptidase, respectively. Peptides having identical or partially overlapped sequences are shown in groups.

Group	Peptides	Amino acid sequence
1	Try(1)-4	Ile-Gly-Ala-Phe-Gly-Tyr-Met-Glu-X-Ser-Ala-Lys
	Try(1)-7	Met-Lys-Gln-Glu-Pro-Val-Lys-Pro-Glu-Glu-Gly-Arg-Asp- Met-Ala-Asn-Arg-Ile-Gly-Ala
	Try(2)-2	Gln-Glu-Pro-Val-Lys-Pro-Glu-Glu-Gly-Arg
	Lys-4	Met-Lys-Gln-Glu-Pro-Val-X-Pro-Glu-Glu-Gly-X-Asp-Met- Ala-Asn-X-Ile-Gly-Ala-Phe-X-Tyr-Met-Glu
2	Try(1)-5	Leu-X-Pro-Leu-X-Tyr-Pro-Asp-Thr-Asp-Val-Ile-Leu
	Try(1)-8	Leu-X-Pro-Leu-X-Tyr-Pro-Asp-Thr
	Try(2)-6	Ser-Tyr-Pro-Asp-Thr-Asp-Val-Ile-Leu
	Try(2)-11	Leu-Arg-Pro-Leu-Ser-Tyr-Pro-Asp-Thr-Asp-Val-Ile-Leu- Met-X-Phe-Ser-Ile-Asp-Ser-Pro-Asp
	Try(1)-3	Ser-Ile-Asp-Ser-Pro-Asp-Ser-Leu-Glu-Asn-Ile-Pro-Glu
3	Try(1)-1	Trp-Thr-Pro-Glu-Val-Lys
	Try(2)-3	Identical with Try(1)-1
4	Try(1)-6	Thr-X-Leu-Leu-Ile-Val-Phe
5	Try(2)-1	Asp-Thr-Ala-Gly-Gln-Glu-Asp-Tyr-Asp-Arg
6	Try(2)-4	Glu-Val-Phe-Glu-Met-Ala-Thr-Arg
7	Try(2)-7	Gln-Val-Glu-Leu-Ala-Leu
8	V8-2	X-Tyr-Val-Ala-Asp-Ile-Glu-Val-Asp-Gly

2. 考察

G_bの正体を明らかにするために、単離精製したG_bを数種のプロテアーゼを用いて消化し、HPLC分離によって得られた部分ペプチドのアミノ酸配列を決定した。その結果、105個のアミノ酸部分配列が決定でき、これらの配列はヒトT細胞よりクローニングされたrho A遺伝子産物[39]と完全に一致し、また、アメフラシ神経節よりクローニングされたrho遺伝子産物[40]のアミノ酸配列と約90%の相同性が認められた。また、rho遺伝子産物には動物種差の存在が知られていて、ヒトとアメフラシ由来のrho遺伝子産物間での相同性は約85%であることが報告されている[40]。ここで得られた結果では、ウシ由来のG_bとアメフラシ由来のrho遺伝子産物のアミノ酸配列には約10%の違いが認められたが、これはヒトとアメフラシで観察されるような動物種差であると考えられる。以上、著者らが行なったプロテインシーケンサーによる解析ではG_bの全アミノ酸配列は決定できなかったが、G_bの部分アミノ酸配列がヒト由来のrho A遺伝子産物の配列と完全に一致すること、アメフラシのそれと高い相同性を示すこと、この蛋白質に動物種差が存在することを考慮すれば、G_bはrho遺伝子産物であることが示唆される。さらに、この結果は、後に同研究室のOgorochiらによって確認され、G_bがrho A遺伝子でコードされる蛋白質と完全に一致することが明らかにされた[41](Fig. 17)。

rho遺伝子はMadaule and Axcelによって酵母[42]、アメフラシ神経節あるいはヒトのT細胞からクローニングされたras p21と約35%の相同性を持つ遺伝子(rho: ras p21 homologue)で[39,40]、特にGTPase活性やGTP/GDP結合活性に関与する5つのドメイン並びに脂質アンカードメインと呼ばれているカルボキシ末端のアミノ酸配列すなわちG蛋白質の性質を保持するために必要なドメインにras p21との高い相同性が観察される。このrho遺伝子産物は様々な動物種での存在が確認されていて、特にヒトのT細胞においてはrho遺伝子によってコードされる互いに相同性の高いrho A~C(それぞれrho cDNA clone12,6,9ともいわれる)の少なくとも3種がクローニングされている[39]。このrho遺伝子産物を蛋白質として生体より

	1	10	20	
Aplysia	M	A	A	I
Gb	M	A	A	I
RhoA	M	A	A	I
	30	40	50	
Aplysia	S	K	D	Q
Gb	S	K	D	Q
RhoA	S	K	D	Q
	60	70		
Aplysia	K	Q	V	E
Gb	K	Q	V	E
RhoA	K	Q	V	E
	80	90	100	
Aplysia	D	T	D	V
Gb	D	T	D	V
RhoA	D	T	D	V
	110	120		
Aplysia	P	E	V	K
Gb	P	E	V	K
RhoA	P	E	V	K
	130	140	150	
Aplysia	S	T	K	R
Gb	H	T	R	R
RhoA	H	T	R	R
	160	170		
Aplysia	I	N	A	Y
Gb	I	G	A	F
RhoA	I	G	A	F
	180	190		
Aplysia	R	A	A	L
Gb	R	A	A	L
RhoA	R	A	A	L

Fig. 17 Comparison of the amino acid sequences encoded by Aplysia rho, cDNA of Gb and human rho clone 12 (rho A).

<Ogorochi et al.>

精製することに成功したのは著者らが初めてであり、さらに、今回得られた情報のなかで最も重要なことは、rho遺伝子産物がADPリボシル化されることを初めて明らかにしたことである。つまり、第1章で述べたように、このADPリボシル化反応はrho遺伝子産物の調節する情報伝達解明の糸口になるかもしれない。

ところで、第2章で述べたようにGb(rho A遺伝子産物)はその性質がras p21とよく類似していてras p21と同様に細胞の分化やトランスフォーミング活性を持つ。また、ras p21はその点変異体が種々の癌組織より検出されていて、癌の発現に関

与する重要な因子であることが推測されている。癌細胞から検出されるras p21の点変異の多くはアミノ末端より12番目あるいは61番目に起こっていて、これらの点変異部位がGTPの結合に関与するドメイン中に位置することからその変異体は活性型であるGTP結合型ras p21を維持する性質を有している。このGTP結合型ras p21維持に基ずく過剰な情報伝達が癌化するメカニズムであると推測されている。また、酵母におけるRAS p21のトランスフォーミング活性はcAMPに依存して起こることが知られている。このセカンドメッセンジャーの明らかな酵母を利用して、Axelらは酵母よりクローニングされた2種のRHO 1とRHO 2のうち、RHO 1のアミノ末端より68番目のGlutamineを人為的にHistidineに代えた ^{68}His -RHO 1を酵母に導入した。 ^{68}His -RHO 1はras p21というコドン61の点変異体に相当するが、この導入によって酵母の減数分裂はうまくいかず、胞子形成が損なわれることを報告した[42]。しかし、この現象はRAS p21の場合と異なり、cAMPに依存しないことから、彼らはRHOとRAS p21の調節する情報伝達は異なることを示唆した。一方、 C_3 酵素を細胞注入してrho遺伝子産物をADPリボシル化すると、NIH3T3細胞やPC-12細胞は細胞体が丸く変化したり、2核の細胞数が増加したり、細胞同士の集簇化が起こり、さらに、 C_3 酵素をXenopus laevisの卵母細胞に注入した場合にはgerminal vesicle(GV)の移動を惹起し、プロゲステロンによるGVの崩壊を促進することが報告された[43]。以上のことから、rho遺伝子産物はras p21とは異なる情報伝達系を制御することによって、細胞分裂などの過程に関与しているものと予想される。

最近、ras p21蛋白質と相同性を持つsec 4遺伝子産物[44,45]、ypt 1遺伝子産物[46,47]、rab遺伝子産物[48,49]といわれるいくつかの低分子量G蛋白質がゴルジ体に局在すること、その変異体を細胞に導入することにより分泌小胞や輸送小胞の細胞内貯留を誘発すること等が明らかにされ、数種の低分子量G蛋白質が分泌反応に関与することが明らかにされた。このように、互いに相同性を示す低分子量G蛋白質も多様性が考えられ、それぞれ調節する情報伝達系が異なることが予想されている。また、secやypt遺伝子産物の解明に、その組織内分布や人為的

に作製した変異体の導入が寄与したが、rho遺伝子産物については前述したように、その変異体の導入による変化が細胞によって異なり、その生理機能を限局することが困難である。すなわち、rho遺伝子産物の機能を解明するためには有用な解析プローブを見いだすことが重要と考えられる。今回、著者らは初めてボツリヌスADPリボシル化酵素の基質蛋白質がrho遺伝子産物であることを明らかにした。既存のADPリボシル化酵素がその基質蛋白質に特異的に作用して、その機能を変化させるというこれまでの報告から考えても、この酵素反応がrho遺伝子産物の機能を解析するための有用な解析プローブに成り得る可能性が予想される。そのためには、ADPリボシル化がG_b(rho A遺伝子産物)の如何なる機能を変化させるのかを明らかにする必要がある。

実 験 の 部

1) 試薬

G_bはウシ副腎可溶性画分より精製した。Trypsinはウシ膵臓由来のType III (10,200 benzoyl-L-arginine ethyl ester units/mg protein)をSigmaより、Staphylococcus aureus protease V8(550units/mg material)はICN Immuno-Biologicalsより、Achromobacter lytidus由来のLysyl endopeptidase(3.1 absorbance units/mg of protein)はWako Chemicalsより購入した。逆相系カラムとして、Aquapore RP-300 column (2.1mm, inner diameter, x 30mm)をApplied Biosystemsより購入した。Phenylthiohydantoin(PTH)-derivative standard kitはPierce Chemical Co.より購入した。Trifluoroacetic acidはHPLC用のものをNacalai Tesque Inc.より購入した。

2) G_bのプロテアーゼ消化

精製したG_bを用いて条件の異なる2度のトリプシン消化実験を行なった。1度目の実験においては、精製したG_b(1.06nmol, 23 μ g)をその1/100(mol/mol)のトリプシン(10.6pmol, 250ng)で消化した(Fig. 15A)。この時、反応は180 μ lの10mM CaCl₂を含むMono Q buffer(20mM Tris·HCl, pH7.8, 1mM EDTA, 1mM dithiothreitol, 5mM MgCl₂, 1mM GDP, 5% ethylene glycol)中で、30°C、12時間行なった。2度目の実験では、精製したG_b(3.78nmol, 83 μ g)に1/100(mol/mol)のトリプシン(37.8 pmol, 900ng)を添加し、全量100 μ lの10mM CaCl₂を含むMono Q buffer中、30°Cで9時間反応させた後、同量のトリプシンを添加し、さらに30°Cで9時間反応させた(Fig. 15B)。これらの反応液は、最終濃度が0.1%になるようにトリフルオロ酢酸を添加することによって反応を停止させ、部分ペプチドを下記条件下で逆相系HPLCにて分離した。また、2度目のトリプシン消化によって得られたピークの中から、その溶出順で9番目のピーク(peak9)をさらにStaphylococcus

aureus protease V8 (プロテアーゼV8) (12pmol)にて消化した。この時の反応は600 μ lの100 mM potassiumphosphate, pH7.8中で、30°C、12時間行なった。この反応液は、最終濃度が1%となるようにトリフルオロ酢酸を添加し、部分ペプチドを下記条件下で逆相系HPLCにて分離した。

別に用意した精製G_b(1nmol, 22 μ g)を1/200(mol/mol)のlysyl endopeptidase (リシルエンドペプチダーゼ) (5pmol)にて消化した。反応は、20mM Tris · HCl, pH8.0中で、30°C、6時間行ない、1%トリフルオロ酢酸酸性にした後、部分ペプチドを下記条件下でHPLCにて分離した。

3) H P L C

Aquapore RP-300 (逆相系C₈ カラム) をBeckman HPLC System Goldに接続して行なった。HPLCは流速0.2ml/minで行ない、溶出するペプチドは210nmでモニターした。プロテアーゼ消化後の各サンプルはトリフルオロ酢酸添加により約pH2に調製し、この操作によって得られた部分ペプチドを逆相系C₈カラムに吸着させ、1度目のトリプシン消化実験では10%アセトニトリルを含む0.1%トリフルオロ酢酸を含有するクロマト用精製水で15分間カラム洗浄した後、30分間で10~70%アセトニトリルのlinear gradientで吸着ペプチドを溶出し、2度目のトリプシン消化実験では0.1%トリフルオロ酢酸含有のクロマト用精製水で15分間カラム洗浄した後、45分間で0~60%アセトニトリルのlinear gradientで吸着ペプチドを溶出分離した。プロテアーゼV8消化の実験では、0.1%トリフルオロ酢酸含有のクロマト用精製水を30分間流した後、30分間で0~55%アセトニトリルのlinear gradientで吸着ペプチドを溶出した。

リシルエンドペプチダーゼ消化実験では、消化ペプチドをHPLCシステムに接続したAsahipak ODP-50 column(6.0 mm, inner diameter, x 150 mm)に吸着させ、吸着ペプチドを流速1.0ml/minで、10~70%アセトニトリルのlinear gradientで溶出分離した。

4) アミノ酸配列の決定

HPLCによって分離した各部分ペプチドのアミノ酸配列は、protein sequenator (Applied Biosystems, model 477A)およびPTH-derivative analyzer (Applied Biosystems, model 120A)にてアミノ末端側より順次その配列を決定した。

第4章 ADPリボース結合部位の決定

第2、3章において、ボツリヌスC₁毒素（D毒素、C₃酵素）の有するADPリボシルトランスフェラーゼの基質蛋白質であるG_bの単離精製に成功し、この蛋白質がras p21類似のrho遺伝子産物であることを明らかにした。また、C₃酵素の細胞内注入は細胞の形態変化を惹起することが報告されていて、その機構はADPリボシル化を受けたrho遺伝子産物の性質の変化に起因するものと予想される。rho遺伝子産物はG蛋白質であることから何らかの情報伝達を制御していると考えられるが、現在のところ明らかにされていない。そこで、このADPリボシル化酵素反応を、未だ説明されていないrho遺伝子産物の調節する情報伝達系の解明に使用することが可能と考えられるが、そのためにはrho遺伝子産物のADPリボース結合部位を決定し、その結合部位を含むドメイン構造がこの蛋白質のどのような機能を制御しているのかを知る必要がある。

1. [³²P] ADPリボシル化G_b（rho遺伝子産物）の精製

[³²P] ADPリボシル化G_bの単離精製は、第2章のG_bの単離精製法を改良して行なった。つまり、G_b単離精製法の最終段階であるMono Q FPLCの直前（TSK-Gel G3000SWゲル濾過後）のG_bを含有するサンプルを常法に従って[³²P] ADPリボシル化し、反応後Centricon 10を用いた濃縮操作により未反応の[³²P] NADを除去した。このサンプルをG_b精製と同じ溶出条件でMono Q FPLCを行なうと、[³²P] ADPリボシル化G_b（rho A遺伝子産物）はADPリボシル化していないG_bよりも遅く溶出（0.1M KCl時）された（Fig. 18）。この操作により、[³²P] ADPリボシル化G_bは非ADPリボシル化G_bばかりでなく、C₁毒素並びに混在する蛋白質とも分離された。この[³²P] ADPリボシル化

G_bが単離精製されたことは、SDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動を用いて確認した。

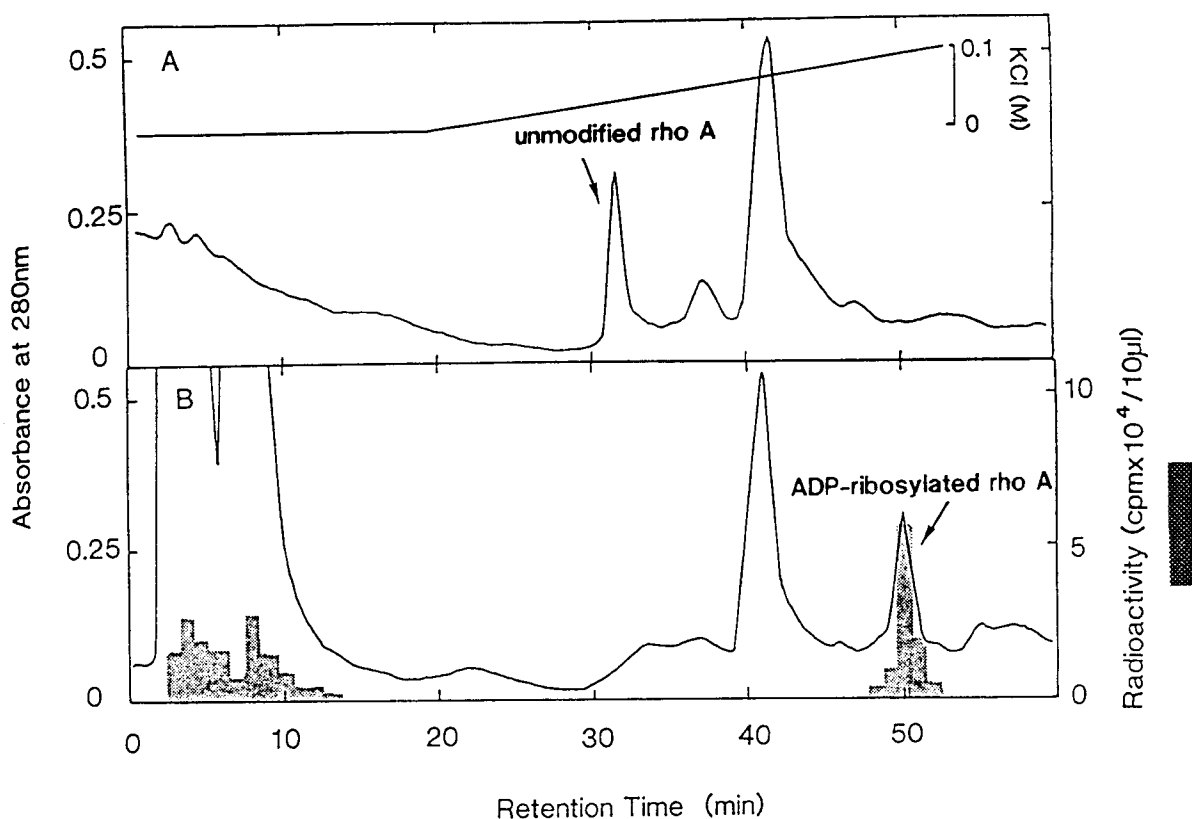


Fig.18 Purification of ADP-ribosylated Gb(rho A gene product). A: Mono Q FPLC of the TSK-gel filtration. B: Mono Q FPLC of the ADP-ribosylated TSK-Gel fractions. Partially purified Gb after the TSK-gel column chromatography was incubated with [α -³²P]NAD and botulinum C₁ toxin in ADP-ribosylating buffer. After the incubation, the mixture was concentrated by the use of a Centricon 10, and the concentrate was subjected to Mono Q FPLC. The column was eluted with linear gradient between 0 and 0.3M KCl. Protein elution was monitored by absorbance at 280nm. The elution profile of Gb was determined by measuring the ³²P radioactivity of each fraction.

2. A D P リボース結合部位の決定

実験の部、Fig. 32~33に従ってA D P リボース結合部位決定のための4実験を行なった。実験は精製した $[^{32}\text{P}]$ A D P リボシル化 G_b を数種のプロテアーゼを用いて消化し、できるだけ構成アミノ酸の少ない $[^{32}\text{P}]$ A D P リボース結合ペプチドを単離して、そのアミノ酸配列からA D P リボース結合部位を決定することを目的とした。

1) 実験 1

単離精製した $[^{32}\text{P}]$ A D P リボシル化 G_b をトリプシンにて消化した。これによって得られた G_b の部分ペプチドをHPLCにて分離すると、4つの放射活性 ($[^{32}\text{P}]$ A D P リボシル化) ペプチドを含むピークが溶出され、これらを溶出順にtrypsin peak I~IVと命名した(Fig. 19)。これらの4つの放射活性ピークを個別にStaphylococcus aureus protease V8 (プロテアーゼV8)にて消化し、その消化ペプチドをHPLCにて分離すると、それぞれから同じ時間(30min)に溶出される単一の放射活性ピークが回収された(Fig. 20:T.I~T.IV)。これらの放射活性ピークに含まれる部分ペプチドのアミノ酸配列をプロテインシークエンサーにて解析した結果、trypsin peak I~III由来の放射活性フラクション (Fig. 20:T.I~T.III) より全て同じアミノ酸配列を持つX-Tyr-Val-Ala-Asp-Ileが、trypsin peak IV由来の放射活性フラクション (Fig. 20:T.IV) よりX-Tyr-Val-Ala-Asp-Ile-Gluが得られた(Tabel 6:1)。この時、Xは未確認であることを示す。このことから、A D P リボース結合アミノ酸はX, Tyrosine, Valine, Alanine, Aspartic acid, Iso-leusineのいずれかのアミノ酸であり、また、トリプシン消化で得られた4つの放射活性ペプチドは、同じ部分アミノ酸配列(X-Tyr-Val-Ala-Asp-Ile)を持つ長さの異なるペプチドであるためHPLC分離操作時には溶出時間が異なることが示唆された。以上より、 G_b のA D P リボース結合部位は1ヶ所であることがわかった。

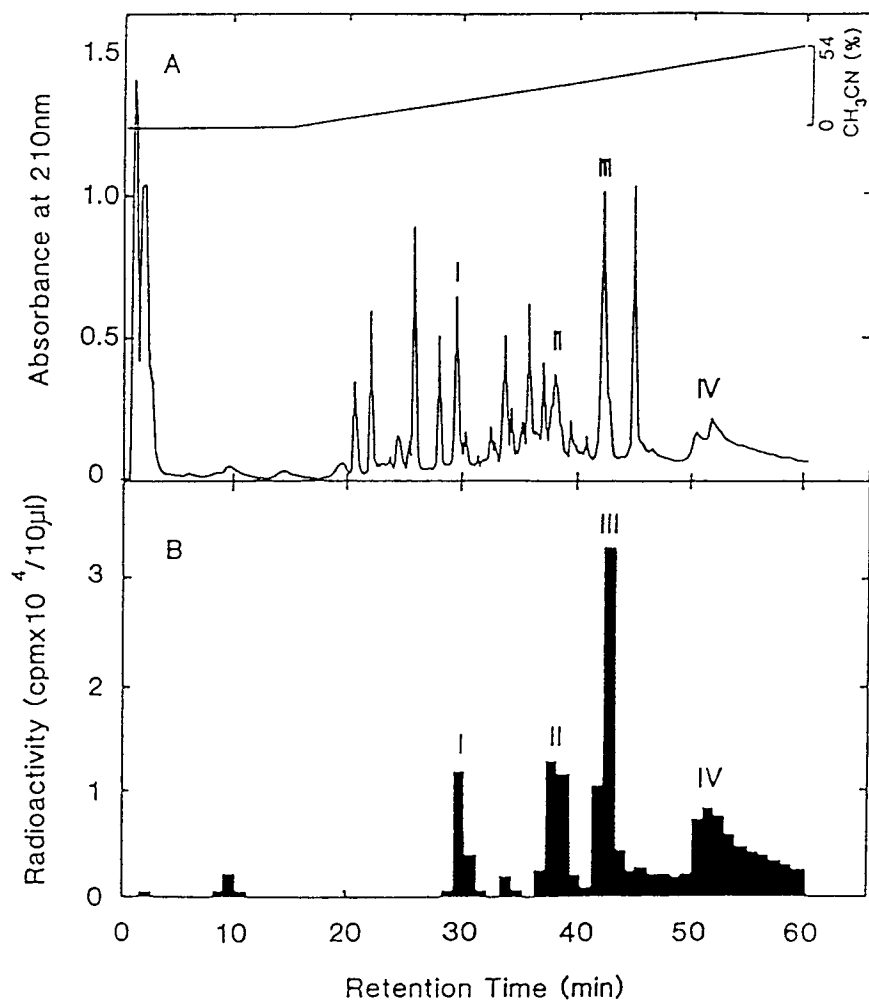


Fig. 19 Reversed-phase HPLC of tryptic digests of [^{32}P]ADP-ribosylated Gb (rho A gene product). Purified [^{32}P]ADP-ribosylated Gb was digested with trypsin, and the digestion products were applied to a reversed-phase HPLC as described under "Methods." A, elution profile of peptides monitored by absorbance at 210nm ; B, elution profile of radioactivity. Radioactive peaks were numbered I-IV as shown in this figure.

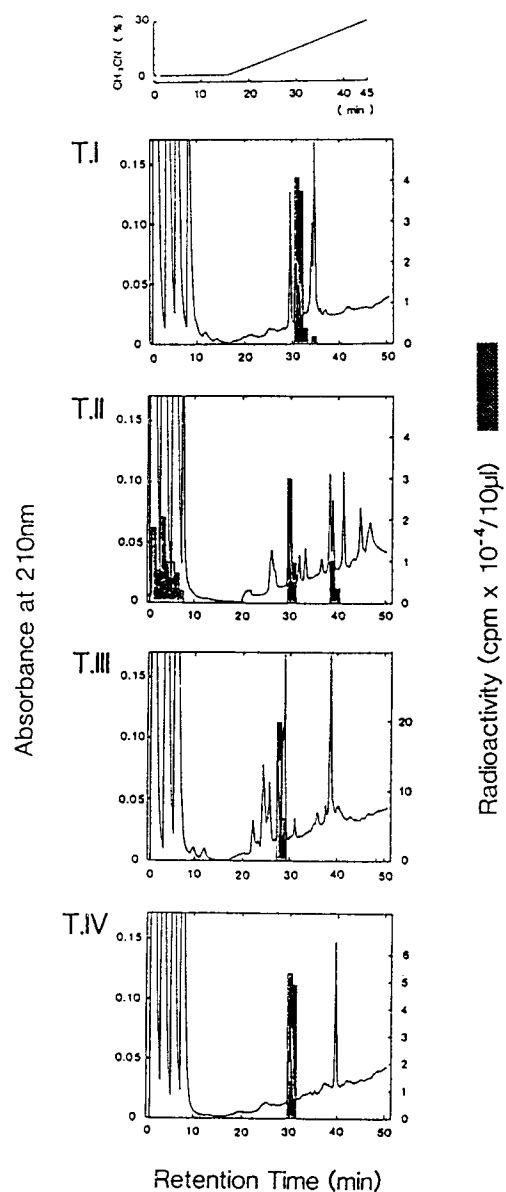


Fig. 20 Reversed-phase HPLC of protease V8 digests of $[^{32}\text{P}]$ ADP-ribosylated trypsin peak I~IV. $[^{32}\text{P}]$ ADP-ribosylated trypsin peak I~IV were digested with protease V8, respectively. These digestion products were applied to a reversed-phase HPLC as described under "Methods." Elution profile of peptides monitored by absorbance at 210nm and elution profile of radioactivity (shadow).

Table 6 Amino acid sequences of the radioactive peptides obtained from [^{32}P]ADP-ribosylated Gb (rho A gene product). Protease digestion of [^{32}P]ADP-ribosylated Gb, isolated of fragment peptides, and amino acid sequencing were performed as described under "Methods."

Experiment	Protease digestions	No.	Sequence
1	Trypsin and protease V8	I, II, III	X-Tyr-Val-Ala-Asp-Ile
		IV	X-Tyr-Val-Ala-Asp-Ile-Glu
2	Trypsin, protease V8, and thermolysin		X-Tyr
3	Trypsin, proline endopeptidase, and thermolysin		Val-Phe-Glu-X-Tyr

2) 実験 2

別に用意した精製 [^{32}P] ADP リボシル化 G_b を実験 1 に従いトリプシンで消化して得られた4放射活性画分を混合し、さらに、プロテアーゼV8で消化した後、HPLCにて放射活性ペプチドを単離した。この方法で得られた放射活性フラクションは1つで、この画分に含まれる部分ペプチドのアミノ酸配列はX-Tyr-Val-Ala-Asp-Ile-Gluであり、実験1の結果が再現された。この放射活性ペプチドをさらにthermolysin (サーモリシン) にて消化し、このサンプルに含まれる部分ペプチドのHPLCによる分離を行なうと1放射活性ペプチドが回収され、そのアミノ酸配列はX-Tyrであった (Table 6:2)。以上のことより、G_b のADPリボース結合部位は未確認のXに相当するアミノ酸かあるいはTyrosine残基であることが示唆された。

3) 実験 3

実験 1、2 の結果を確認するために、別に用意した $[^{32}\text{P}]$ ADP リボシル化 G_b を実験 1 に従ってトリプシン消化し、得られた 4 つの放射活性ピークを混合して、それを Proline endopeptidase (プロリンエンドペプチダーゼ)、サーモリシンにて順次、消化および部分ペプチドの分離を行なった。この方法によって最終的に 1 放射活性ペプチドが単離され、そのアミノ酸配列は Val-Phe-Glu-X-Tyr であった (Table 6:3)。この放射活性ペプチドのアミノ酸配列は、実験 1、2 で得たペプチドと X-Tyr で共通構造を持ち、かつ連続するペプチド: Val-Phe-Glu-X-Tyr-Val-Ala-Asp-Ile-Glu であることがわかった。この配列は、rho 遺伝子産物とのホモロジー解析より、rho A 遺伝子産物のアミノ末端より 38~47 番目のアミノ酸配列と完全に一致した (Fig. 17 参照)。この結果から、ADP リボース結合部位は rho A 遺伝子産物のアミノ末端より 41 番目のアミノ酸 X (未確認) あるいは 42 番目の Tyrosine 残基であることが再度確認された。

4) 実験 4

プロテインシーケンサーを用いて、放射活性ペプチドを構成するアミノ酸配列を決定し、同時に各アミノ酸の回収量および含有する放射活性を測定した。実験 3 で得られた放射活性ペプチド: Val-Phe-Glu-X-Tyr のエドマン分解後に回収した各アミノ酸の放射活性を測定したが、いずれのアミノ酸からも放射活性は検出されず、解析後のシーケンスフィルター上に固着残存していることが明らかとなった (Table 7:1)。また、放射活性ペプチド: Val-Phe-Glu-X-Tyr の各アミノ酸の回収量を比較してみると、Valine, Phenylalanine, Glutamic acid 残基はほぼ同量の回収率が観察され、Tyrosine 残基の回収率はそれに比べて少なく、未確認のアミノ酸 X に相当するサイクルでは何も回収されていなかった (Table 7:1)。同様の結果は、実験 1、2 で得られた放射活性ペプチド: X-Tyr-Val-Ala-Asp-Ile、X-Tyr の解析時にも観察された (data not shown)。一方、ADP リボシル化していない G_b をトリプシンとプロリンエンドペプチダーゼにて順次消化した後、カラム

分離を行なうと、ADPリボース結合部位と同配列を含有するペプチド：Thr-Val-Phe-Glu-Asn-Tyrが得られた。このペプチドを構成する各サイクルのアミノ酸回収率を求めた(Table 7:II)結果、Valine, Phenylalanine, Glutamic acid,

Table 7 Sequence analyses of proteolytic peptides

Sequence analyses of the [^{32}P]ADP-ribosylated peptide from experiment 3 and the corresponding peptide from unmodified protein from experiment 4 were carried out as described under "Methods." The yield of each cycle was calculated by comparing the height of each phenylthio-hydantoin amino acid peak with that of a standard phenylthiohydantoin derivative.

ADP-ribosylated peptide			Unmodified peptide			Ratio I/II
(I)			(II)			
Cycle	Amino acid	Yield	Cycle	Amino acid	Yield	
		pmol			pmol	
			1	Thr	88.2	
1	Val	21.5	2	Val	81.3	0.26
2	Phe	33.7	3	Phe	82.1	0.41
3	Glu	23.9	4	Glu	88.6	0.27
4	ND ^a		5	Asn	88.4	
5	Tyr	9.84	6	Tyr	12.7	0.77

^aND, not detected

Tyrosine残基は実験3の放射活性ペプチドの場合とほぼ同じ割合で回収されたのに対し、放射活性ペプチドの解析の際まったく検出されなかった未確認Xが、ADPリボシル化していないG_b由来ペプチドよりAsparagine残基として確認された(Table 7)。以上のことより、ADPリボース結合アミノ酸はAsparagine残基であり、ADPリボシル化を受けたAsparagine残基は性質が変化して、このアミノ酸シーケンスによる解析時にはエドマン分解後シーケンスフィルター上に固着残存するため未確認のアミノ酸Xとして認識されることが示唆された。

3. 中性ヒドロキシルアミン中でのG_bとADPリボースの結合安定性

ADPリボースはその結合するアミノ酸の違いによって中性ヒドロキシルアミン中での安定性が異なることをHilzsら[50,51]、Hsiaら[52]、Ogataら[53,54]は報告した。この分類に従って、ADPリボースとG_bの結合安定性を調べた。その結果、G_bとADPリボースの結合安定性は、中性ヒドロキシルアミン中で5時間安定であった(Fig. 21)。

4. GTP γ S結合活性およびintrinsic GTPase活性に及ぼすADPリボシル化の影響

ADPリボシル化したG_bおよびADPリボシル化していない(unmodified)G_bのGTP γ S結合活性とG_bそれ自身のGTPase活性(intrinsic GTPase活性)を比較したが、いずれの活性においても両者間に差は認められなかった(Fig. 22)。以上のことより、G_bのADPリボシル化は、GTP γ S結合活性とintrinsic GTPase活性に影響を与えないことが示唆された。

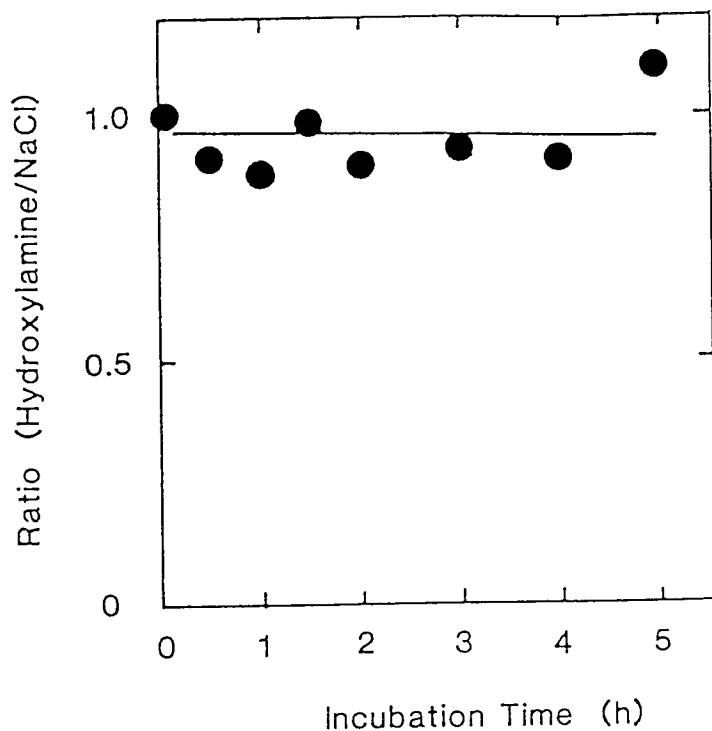


Fig. 21 Stability of ADP-ribose Gb bond in neutral hydroxylamine. Gb was [^{32}P]ADP-ribosylated by C_1 toxin was incubated at pH7.5 with 0.5M hydroxylamine or NaCl at 37°C for indicated times as described under "Methods." The Gb-associated radioactivity was determined in each incubation, and the ratio of the remaining radioactivity in the presence of hydroxylamine and NaCl is shown.

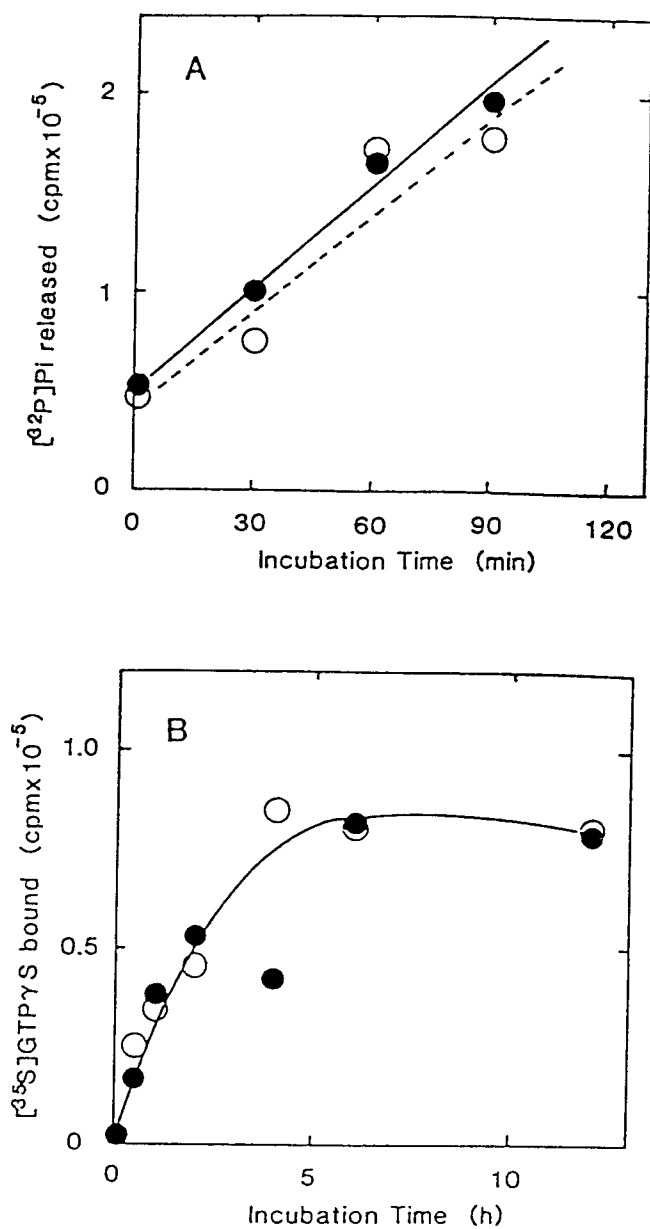


Fig. 22 GTPase-(A) and [³⁵S]GTPγS-binding(B) activities in ADP-ribosylated and unmodified Gb. GTPase- and GTPγS-binding activities were measured in the ADP-ribosylated (●) and unmodified Gb (○) as described under "Methods."

5. GAP活性に及ぼすADPリボシル化の影響

1) G_b (rho A遺伝子産物) に作用するGAP(GTPase activating protein)の部分精製

G_b に作用するGAP (rho GAPと略す) をウシの副腎より部分精製した。rho GAPは副腎の細胞膜画分および細胞質画分(cytosol)のいずれにも存在し、著者はrho GAPを細胞質画分より部分精製した。rho GAPはFig. 23に示すように硫酸55%飽和によって析出(AS 0/55に含有)する性質を持ち、この塩析法による上清(AS 55/100: G_b はこの画分中に含有される)中にはほとんど検出されないことがわかった。得られたAS 0/55画分を透析した後、DEAE-Sepharoseカラムクロマトグラフィーを行なうと、rho GAPはカラムに結合しないフラクション(DEAE GAP-I)と0.08M KCl時に溶出されるフラクション(DEAE GAP-II)に分離された(Fig. 24)。この時、c-ras p12に対するGAP(ras GAP)の溶出を測定するとras GAPはDEAE GAP-I画分中に含有され、DEAE GAP-II画分中に含有されていないことがわかった(Fig. 24, 25A)。また、DEAE GAP-II画分は用量に依存して G_b (rho A遺伝子産物) のGTPase活性を上昇させた(Fig. 25B)。逆に、Gibbsより提供された精製ras GAPはc-ras p21のGTPase活性を上昇させるが、 G_b のGTPase活性には影響を及ぼさなかった(Fig. 26)。以上のことより、DEAE GAP-II画分にはras p21に作用しないrho GAPであることが明らかとなったので以下に示す実験ではこのDEAE GAP-II画分を使用した。また、DEAE GAP-II画分に含有するrho GAPの分子量を明らかにする目的でこの画分のTSK-Gel G3000SWによるゲル濾過を行なった結果、rho GAPは分子量約30,000時に溶出され(Fig. 27)、既にその構造が決定されている分子量約120,000のras GAPとは異なることが示唆された。

2) rho GAP活性に及ぼすADPリボシル化の影響

[γ - 32 P]GTP結合 G_b に部分精製したGAP(GTPase activating protein)を添加し、上昇する G_b のGTPase活性がADPリボシル化によって影響を受けるか否かについて

て検討したが、両者間に差は認められず(Fig. 28)、A D P リボシル化は rho GAP 活性に影響を与えないことがわかった。

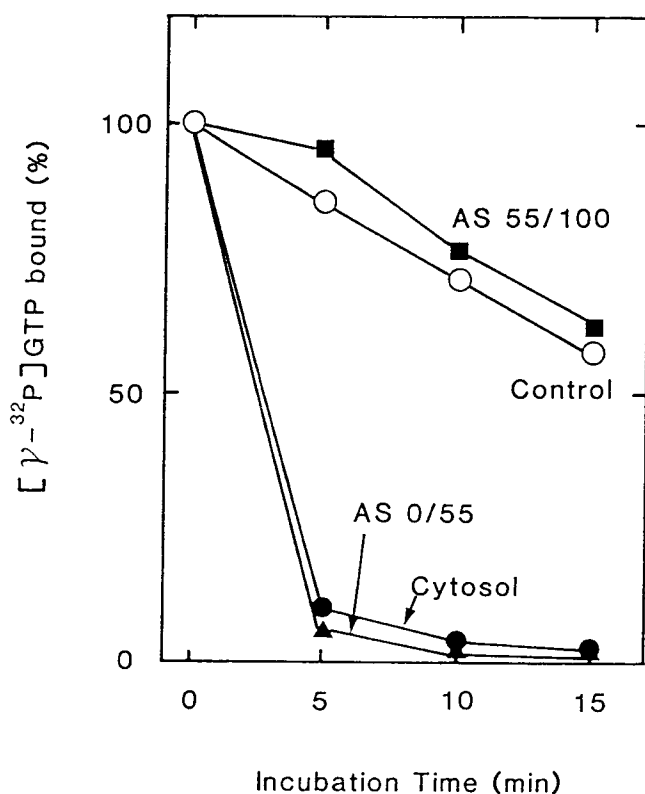


Fig. 23 rho GAP activity of cytosol, and ammonium sulfate fractions. The homogenate of bovine adrenal gland was centrifuged at 10,000 x g for 20 min and then at 100,000 x g for 60min. The supernatant(cytosol) was pooled and ammonium sulfate was added to the supernatant to 55% saturation. The mixture was stirred at 4°C for 60min, and then centrifuged at 10,000 x g for 20min. The precipitate were dissolved in GAP buffer(AS 0/55). The supernatant of 55% saturation showed AS 55/100. [γ - 32 P]GTP-bound Gb(rho A gene product) with incubated with cytosol(●), AS0/55(▲), AS55/100(■), or without rho GAP(○), and time dependent determined.

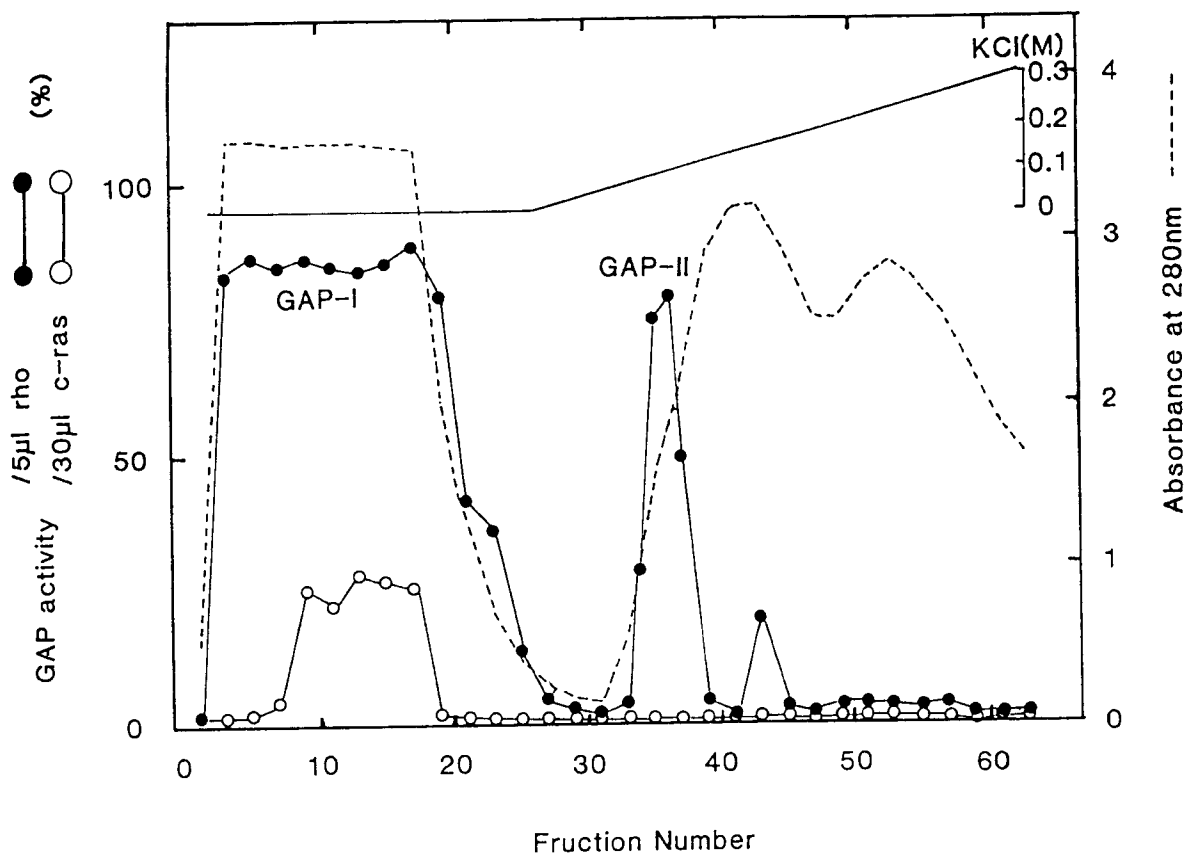


Fig. 24 DEAE-Sepharose chromatography of ammonium sulfate fraction (AS 0/55). The AS 0/55 fraction was applied to a DEAE-Sepharose as described under "Methods." The straight line in the figure shows a linear gradient between 0 and 0.3M KCl. Protein elution was monitored by absorbance 280 nm(broken line). Aliquots, 5 and 30 μ l, of each fraction were used to determined the stimulation of GTP hydrolysis of rho A gene product (●) and c-ras p21 (○) as described under "Methods."

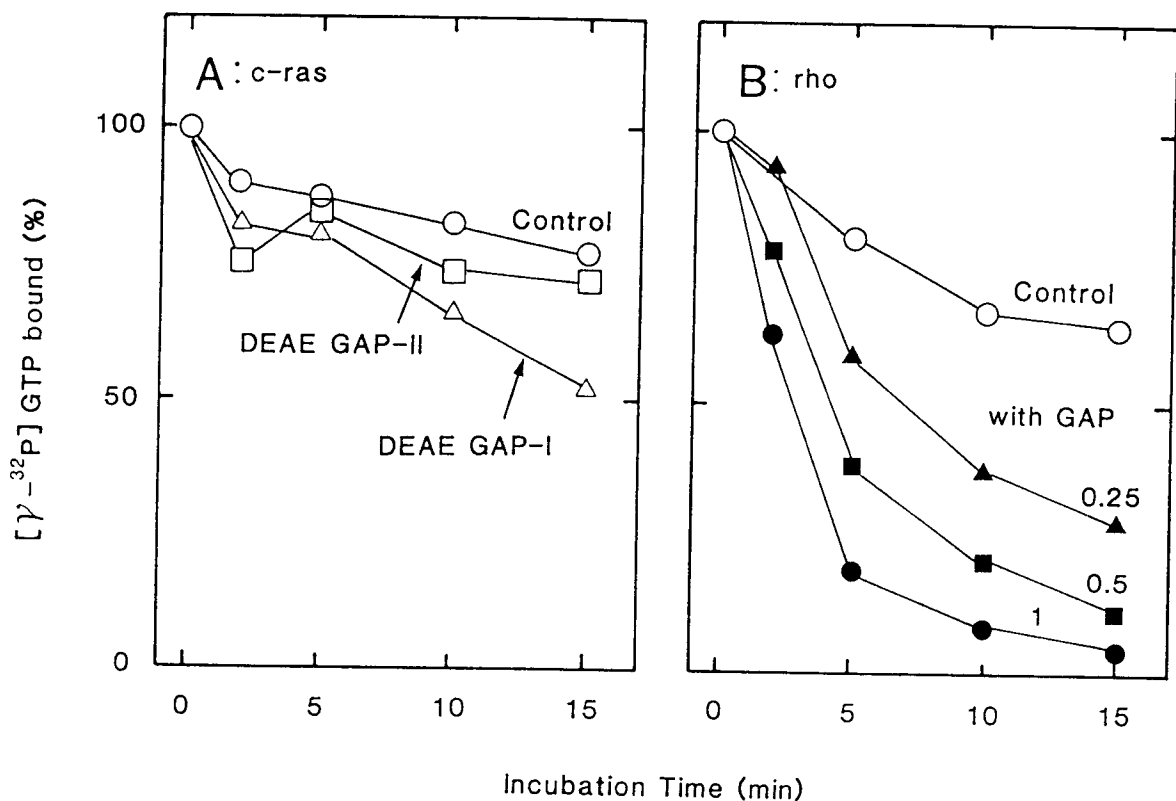


Fig. 25 Stimulation of GTP hydrolysis of the c-ras p21(A) and the rho A gene product by the partially purified rho GAP. A, $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]\text{GTP}$ -bound c-ras p21 was incubated with DEAE GAP-I (Δ), DEAE GAP-II (\square) or without (\circ) the partially purified rho GAP and time-dependent GTP hydrolysis was determined. B, $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]\text{GTP}$ -bound rho gene product was incubated with 0.25 μl (\blacktriangle), 0.5 μl (\blacksquare), 1 μl (\bullet) DEAE GAP-II or without DEAE GAP-II (\circ), and time-dependent GTP hydrolysis was determined.

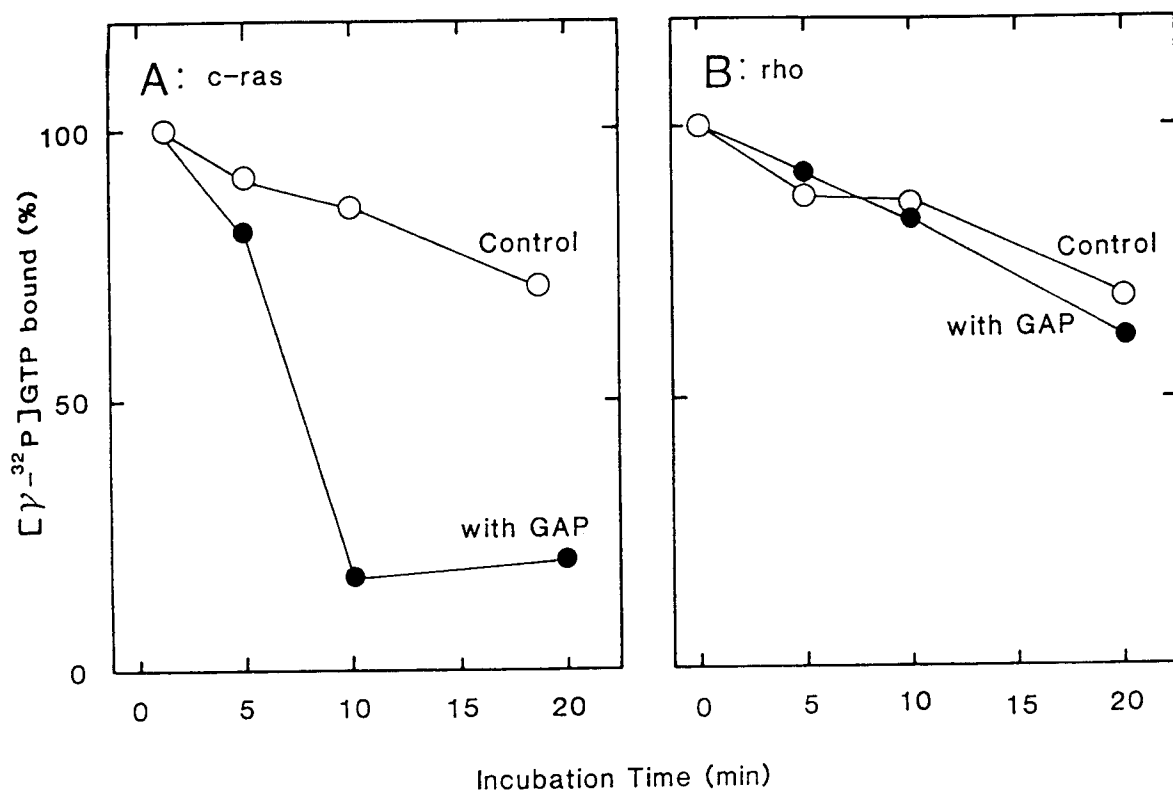


Fig. 26 Stimulation of GTP hydrolysis of the c-ras p21(A) and the rho A gene product(B) by the purified ras GAP. A, $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]\text{GTP}$ -bound c-ras p21 and Gb(rho A gene product) was incubated with (●) or without(○) the purified ras GAP, and time-dependent GTP hydrolysis was determined.

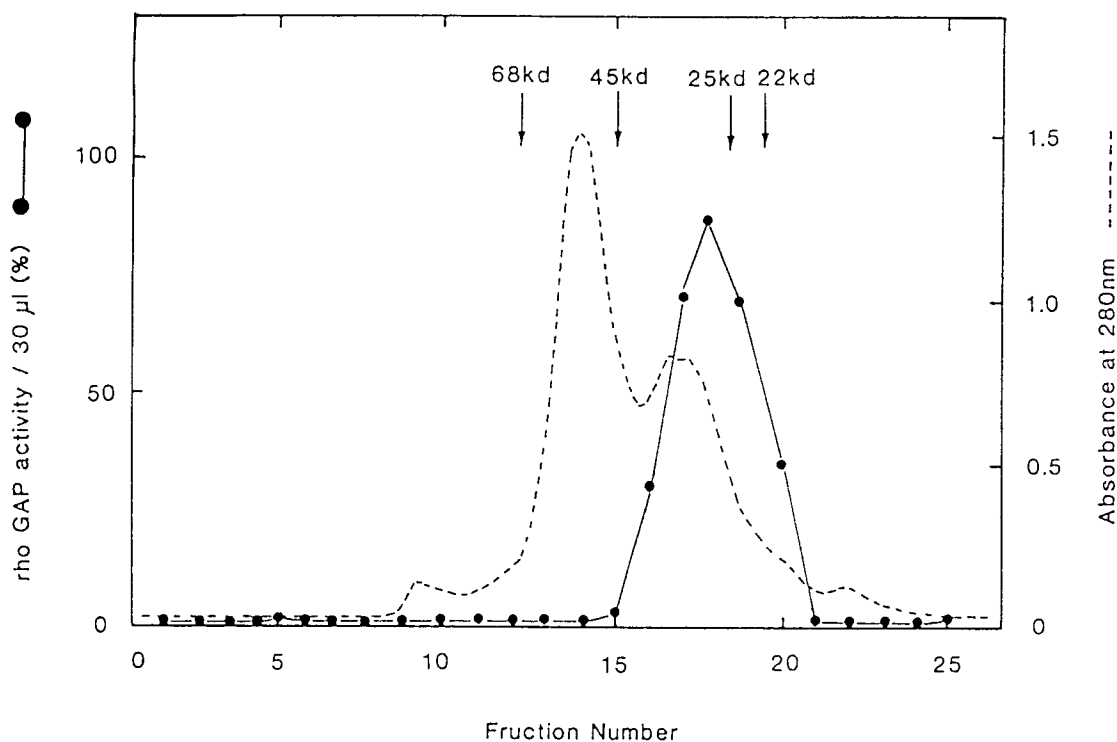


Fig. 27 TSK-Gel G3000SW gel filtration of DEAE GAP-II fraction. The concentrarated DEAE GAP-II fraction, 2ml, was divided into four aliquot containing 500 μ l each. Each aliquot was then applied to a TSK-Gel G3000 SW column connected with a Pharmacia FPLC system as described under "Methods." A typical elution profile is shown. Protein concentration (broken line) and rho GAP activity(●) of 30ml aliquot of each fraction. Arrows shows elution positons of calibration protein with known molecular size : 68kd;serum albumin, 45kd;ovalbumin, 25kd;chymotrypsinogen A, 22kd;Gb(rho gene product).

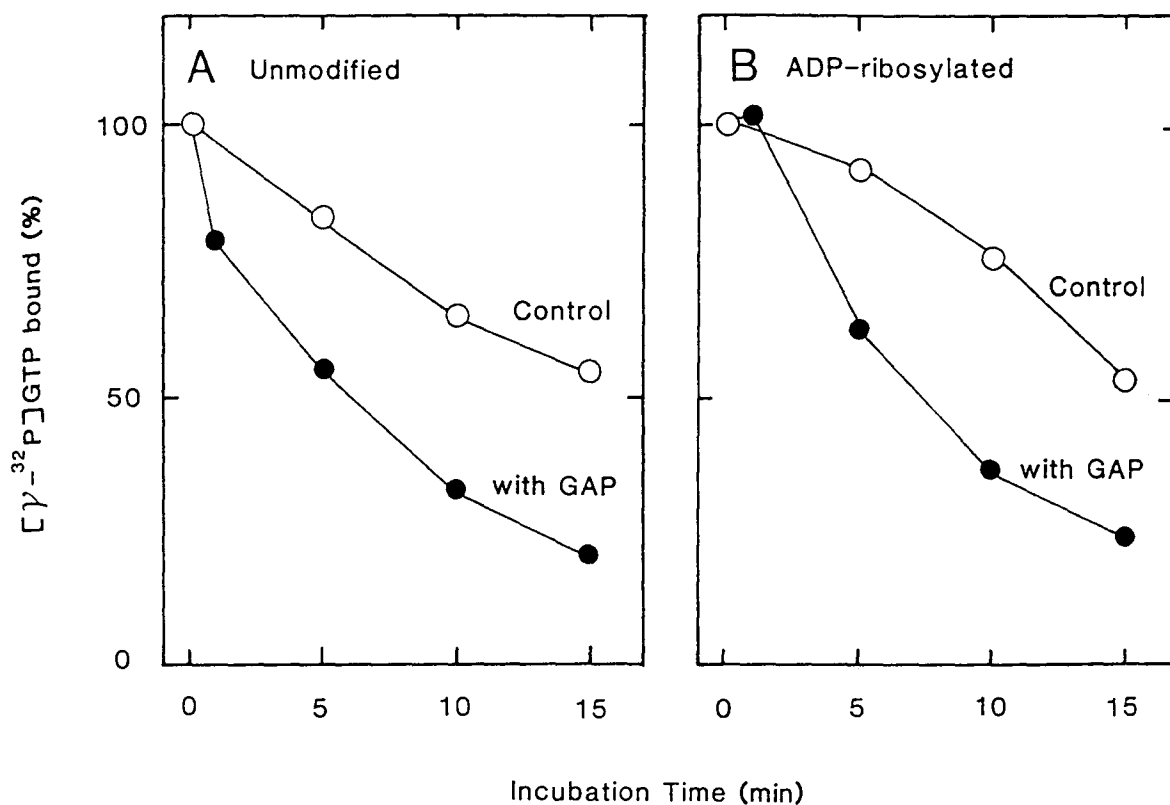


Fig. 28 Effect of the ADP-ribosylation on stimulation of GTP hydrolysis of the rho A gene product by the partial purified rho GAP. Either unmodified(A) or ADP-ribosylated(B) $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]\text{GTP}$ -bound rho gene A product was incubated with(●) or without(○) the partial purified rho GAP(DEAE GAP-II fraction), and time-dependent GTP hydrolysis was determined. ADP-ribosylation of the rho A gene product was verified in parallel experiment using $[\alpha\text{-}^{32}\text{P}]\text{NAD}$.

6. 考察

プロテインシーケンサーは、エドマン分解を自動化した機器で、ペプチドを構成するアミノ酸配列をアミノ末端から順次自動的に決定することができる。その原理は、Fig. 29に示したようにシーケンスフィルターをポリブレン処理することによって構造決定したいペプチドをこのフィルター上に結合させ、そのアミノ末端のアミノ酸をフェニールチオヒダイント（以下、PTHと略す）化して切断し、そのアミノ末端に位置していたPTHアミノ酸の構造を次々にHPLCにて自動的に決定する機器である。また、エドマン分解後のPTHアミノ酸は一部を構造決定のために使用し、その残りを回収することができる。これを利用して、アミノ酸配列の決定と同時に各サイクルのアミノ酸の放射活性を順次測定することができる。つま

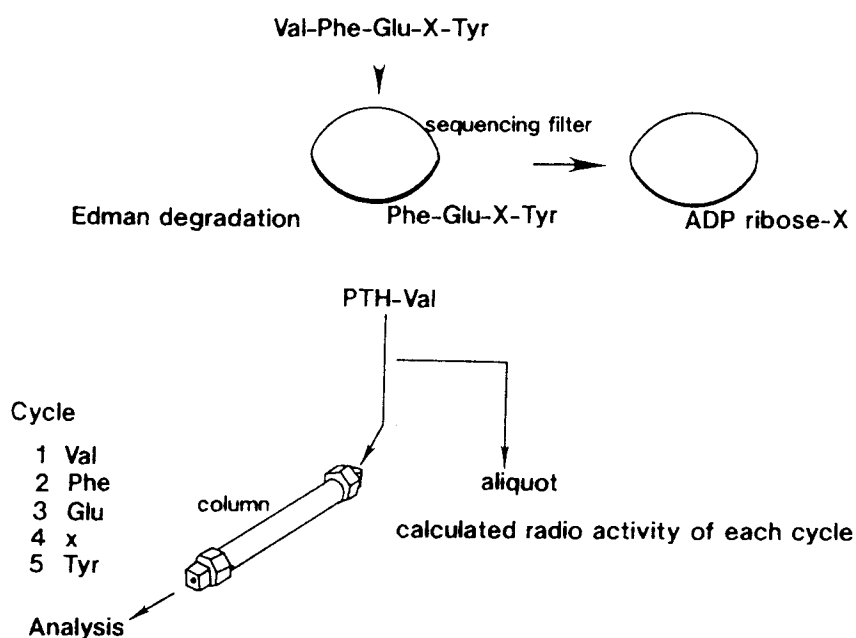


Fig. 29 Protein Sequenator

り、シーケンサーを利用することで、 $[^{32}\text{P}]$ ADPリボース結合アミノ酸の決定が可能である。第2章において、 G_b のADPリボース結合部位は1カ所であることが予想されている。そこで、まず $[^{32}\text{P}]$ ADPリボシル化した G_b を数種のプロテアーゼを何通りかの方法で組合せて消化し、できるだけ構成アミノ酸の少ない $[^{32}\text{P}]$ ADPリボシル化ペプチドを単離して、プロテインシーケンサーによる解析からADPリボース結合部位の予測を試みた。その結果、3種の異なる $[^{32}\text{P}]$ ADPリボシル化ペプチド：X-Tyr-Val-Ala-Asp-Ile-(Glu)，X-Tyr，Val-Phe-Glu-X-Tyr（下線部は共通構造）を得た。これらのペプチドのアミノ酸配列はrho A遺伝子産物のクローニングにより明らかにされたアミノ酸配列のアミノ末端から38から47番目（ $^{38}\text{Val-Phe-Glu-X-Tyr-Val-Ala-Asp-Ile-}^{47}\text{Glu}$ ）を構成する部分配列と完全に一致する。また、これらの $[^{32}\text{P}]$ ADPリボシル化ペプチドに共通するアミノ酸配列はX-Tyrであることから、 ^{41}X （未確認）か $^{42}\text{Tyrosine}$ 残基にADPリボースが結合していると考えられた。これら3種の $[^{32}\text{P}]$ ADPリボシル化ペプチドのプロテインシーケンサーによる解析時に、どのサイクルに放射活性が含有されるかを確認できれば $[^{32}\text{P}]$ ADPリボース結合部位は決定できるはずである。しかし、 $[^{32}\text{P}]$ ADPリボシル化ペプチド：Val-Phe-Glu-X-Tyrの解析（Table 7:I）において、本来ならば第4サイクル目のXか第5サイクル目のTyrosineのエドマン分解時に放射活性が回収されるはずが実際にはまったく回収されず、放射活性はペプチドを結合させたシーケンスフィルター上に解析後も固着残存していた。同様の結果は、他の $[^{32}\text{P}]$ ADPリボシル化ペプチドの解析時にも観察され、このことがADPリボース結合部位の決定を困難にした。そこで著者らは、 $[^{32}\text{P}]$ ADPリボースが未確認Xに相当するアミノ酸に結合していて、エドマン分解によって切断された $[^{32}\text{P}]$ ADPリボシル化・Xはシーケンスフィルター上に固着残存するため構造が決定できず、その結果、放射活性はシーケンスフィルター上に残存するのであらうと考えた。この仮説が正しければ、ADPリボシル化していないペプチドの解析においてはXに相当するアミノ酸は決定できるはずであり、また、Xを除くその周囲

のアミノ酸はADPリボシル化と非ADPリボシル化ペプチドのどちらの場合も同程度の回収ができるはずである。 [^{32}P] ADPリボシル化ペプチド: Val-Phe-Glu-X-Tyrの各アミノ酸の回収量を比較してみると、Valine、Phenylalanine、Glutamic acid残基はほぼ同量の回収率が観察され、Tyrosine残基の回収率はそれに比べて少なく、未確認のXに相当するサイクルではアミノ酸は回収されていなかった (Table 7:I)。一方、ADPリボシル化していないrho遺伝子産物をトリプシンとプロリンエンドペプチダーゼで消化し、ADPリボース結合部位を含むペプチド: Thr-Val-Phe-Glu-Asn-Tyrの各サイクルのアミノ酸回収率を求めると (Table 7:II)、Threonine、Valine、Phenylalanine、Glutamic acid、Tyrosine残基は実験3の放射活性ペプチドの場合とほぼ同様に回収されたが、 [^{32}P] ADPリボシル化ペプチドの解析時に検出されなかったXが、ADPリボシル化していないrho遺伝子産物由来ペプチドよりAsparagine残基として確認された。このことより、ADPリボース結合アミノ酸はAsparagine残基であることが明らかとなった。すなわち、従来プロテインシーケンサーによって解析可能なAsparagine残基がADPリボシル化を受けてその性質が変化し、エドマン分解により切断された後、ADPリボースが結合したAsparagine残基はシーケンスフィルター上に固着残存していたものと思われる。

これまでに報告されているADPリボース結合アミノ酸について述べると、Fig. 31に示すようにジフテリア毒素[15,55]やpseudomonas exotoxin A[16]はelongation factor 2 (EF-2) のアミノ末端より426番目のHistidine由来のアミノ酸であるDiphthamide残基[56]にADPリボースを結合させ、リボゾームにおけるペプチドの伸長の停止に基ずく細胞死を誘発する[15,55]。百日咳毒素はG_i、G_o、G_tのカルボキシ末端から4番目（それぞれアミノ末端より352番目、307番目、347番目）に位置するCystein残基に[57]ADPリボースを結合させ、これらG蛋白質と受容体の連関を切断する[24,25]。コレラ毒素によるADPリボシル化はG_sのアミノ末端から201番目あるいはG_tのアミノ末端から174番目のArginine残基上に起こり[58]、GTPase活性を阻害して活性型G蛋白質を保持する[22,23]。ポ

ツリヌス C₂ 毒素では骨格筋の G アクチンのアミノ末端から 177 番目の Arginine 残基に A D P リボースを結合させ、アクチンの重合を阻害することが知られている [59-61]。他にポリ A D P リボシル化の起こるアミノ酸として Histone H2B の Glutamic acid 残基と Histone H1 の Glutamic acid 残基あるいはカルボキシ末端の Lysine 残基が報告されている [53, 54]。つまり、A D P リボシル化酵素はそれぞれ特定のアミノ酸に A D P リボースを結合させる性質を有していて、しかも、これらのアミノ酸はそれぞれ特定の蛋白質の限局された部位に位置している。Hilts ら [50, 51]、Hsia ら [52] あるいは Ogata ら [53, 54] の報告によれば、A D P リボースとそのアクセプターとなるアミノ酸との結合は中性ヒドロキシルアミン中での安定性を用いることによって分類が可能で (Fig. 30)、その安定性は A D P リボース・Cystein、Diphthamide (2h 以上安定) > Arginine (T_{1/2}=1h) > Glutamate (不安

0.5 M NH₂OH

cysteine bond
diphthamide bond > arginine bond > glutamate bond
(T_{1/2} < 2hr)
> 2hr

0.5 M NaOH

botulinum
ADP-ribosyltransferase > arginine bond > cysteine bond > glutamate bond

1 mM HgCl₂

botulinum
ADP-ribosyltransferase > cysteine bond
← arginine bond →
stable labile

Fig. 30 Stability of ADP-ribose protein bonds in neutral hydroxylamine, sodium hydroxide, and mercuric chloride.

ド様結合と考えられ、中性ヒドロキシルアミン中で不安定であると予想される。これに対し、ADPリボース結合部位がAsparagine残基であればその結合はNグリコシド様結合であり、中性ヒドロキシルアミン中で安定であると考えられる。今回の実験結果では、ADPリボース・rho遺伝子産物の中性ヒドロキシルアミン中での安定性は5時間安定で(Fig. 21)、この安定性はADPリボース・Cysteinおよび・Diphthamideに匹敵する。このことから、G_bのADPリボース結合部位はAsparagine残基であることが確認された。著者の報告と同じ頃、AktoriesらはADPリボース・Cystein結合がHgCl₂中で不安定である(Fig. 30)のに対し、ADPリボース・rho遺伝子産物が安定であることからrho遺伝子産物のADPリボース結合アミノ酸はCysteinとは異なることを示唆した[62]。また、著者らの報告の後にMohrらはADPリボース結合部位であるアミノ末端から41番目のAsparagine残基をIsoleusine残基に変異させたrho遺伝子産物がADPリボシル化を受けないことを報告し[63]、著者らの結果をより確かなものにした。以上、G_b(rho遺伝子産物)のADPリボース結合アミノ酸はAsparagine残基であり、rho A遺伝子産物とのホモロジー解析よりアミノ末端より41番目に位置するアミノ酸であることが明らかとなった。また、ADPリボース結合アミノ酸としてはAsparagine残基は初めての報告である。

一方、Sigalらは人為的に作製したras p21あるいは酵母(*Saccharomyces cerevisiae*)のRAS蛋白質の点変異体のいくつか、on/offスイッチつまりGTP/GDP結合活性やGTPase活性に影響を与えることなくその活性を変化させることを明らかにした[64]。これらの点変異体はras p21およびRAS蛋白質の部分アミノ酸配列である³⁵Thr-Ile-Glu-Asp-Ser-⁴⁰Tyrを³⁵Thr→Ala、³⁶Ile→Ala、³⁸Asp→Alaあるいは⁴⁰Tyr→Lysに変換したもので、NIH3T3細胞においてはras p21で観察されるフォーカス形成能が点変異体発現により低下し、酵母においてはRAS蛋白質の刺激にともないアデニレートシクラーゼ活性が上昇する[27]はずであるが変異体RAS蛋白質の導入によってこの活性の減少が認められた。それ故、このアミノ酸配列をras p21あるいはRAS蛋白質のエフェクター分子との結合に関与するドメインと推

定した。このエフェクターとはras p21の標的蛋白質であり、ras p21の調節する情報伝達系の下流側に存在する分子のことで、ras p21ではそのエフェクター分子は明らかにされていない。また、GDP結合型ras p21とGTP結合型ras p21のX線解析による3次構造を比較した場合に、このエフェクター領域に最も大きな変化が生じ、何らかの因子を受け取るようなポケットができることが報告されていて[65,66]、このことも、この領域がエフェクタードメインであることを示すものかもしれない。ところで、G_b (rho A遺伝子産物) はras p21と35%の相同性を示し、特にGTP/GDP結合活性あるいはGTPase活性に関与するドメインに高い相同性が認められ、また膜への移行に関与するカルボキシ末端の領域の構造的な特徴が類似していて、ras p21の性質をG_b (rho A遺伝子産物) もまた保持していると考えられる。そこで、この両者の相同性をみてみると、G_bのADPリボース結合部位である⁴¹Asparagine残基はras p21の³⁹serineに対応し、推定上のエフェクタードメイン上に位置する。先にも述べたように、ADPリボシル化はターゲットとなる蛋白質の特定の部位に起こり、その結合部位を含むドメイン構造の担う機能を変化させる。つまり、G_b (rho A遺伝子産物) のADPリボシル化は、rho遺伝子産物と未知のエフェクター分子との結合を修飾するものと予想される。事実、Fig. 22に示すようにG_bのADPリボシル化はGTPγS結合活性やそれ自身のGTPase活性にまったく影響を与えない。しかも、C₃酵素の細胞内注入は細胞の形態変化を誘発する[43,67]ことから考えても、G_bのADPリボシル化はG_bとエフェクター分子との連関に変化を与えるものと予想される。

最近、ras p21に対するras GAPの存在が明らかになり[68,69]、ウシ脳の可溶性画分より蛋白質として単離精製され[70]、さらにはクローニングによって全構造が明らかにされた[71,72]。ras GAPは活性体であるGTP結合型ras p21の不活性体への変換機構(offスイッチ)であるGTPase活性を上昇させる調節因子と考えられていた。しかし、ras p21とras GAPが相互作用するためにはras p21のエフェクター領域が必要であることが報告され[73]、ras GAPがras p21のエフェクター分子の1つと想定された[74]。しかしながら、Fig. 28に示すようにG_b (rho A遺伝子

産物) への rho GAP の作用は A D P リボシル化によって影響を受けなかった。以上のことから、rho 遺伝子産物の A D P リボシル化は rho GAP ではないエフェクター分子との結合を変化させることが示唆された。また、酵母 RAS 蛋白質を除く低分子量 G 蛋白質のエフェクター分子は現在のところ明らかにされておらず、また、そのツールも発見されていない。それ故、この酵素反応は低分子量 G 蛋白質のエフェクター分子の解明に寄与する最初のものと考えられる。

実 験 の 部

1) 試薬

G_b(rho A遺伝子産物)はウシ副腎可溶性画分より精製した(第2章)。ボツリヌスC₁毒素(L-form)は大阪府立大学の阪口玄二教授より提供して頂いた。[α -³²P]NAD(34Ci/mmol), [³⁵S]GTP γ S(1350Ci/mmol), [α -³²P]GTP(33Ci/mmol), [γ -³²P]GTP(30Ci/mmol), [γ -³²P]GTP(6000Ci/mmol)はDu Pont-New England Nuclearより購入した。Trypsinはウシ脾臓由来のもので、type III(10200 benzoyl-L-arginine ethyl ester units/mg of protein)をSigmaより、Staphylococcus aureus protease V₈(550units/mg of material)はICN Immuno-Biologicalsより、Proline endopeptidaseはFlavobacterium meningosepticum由来のもの(35units/mg of protein)をSeikagaku Kogyoより、ThermolysinはBacillus thermoproteolyticus由来のもの(8670units/mg of protein)をNacalai Tesqueより購入した。Trifluoroacetic acid(HPLC grade), hydroxylamine hydrochlorideはNacalai Tesqueより購入した。Aquapore RP-300 column(2.1, inner diameter, x 30 mm)とSepheri 5RP-18 column(2.1 mm, inner diameter, x 30 mm)はApplied Biosystemsより、Phenylthiohydantoin derivative standard kitはPierce Chemical Co.より購入した。Norit AはWako Pure Chemical より購入した。

2) [³²P] ADPリボシル化G_b(rho A遺伝子産物)の精製

G_bを第2章に従って、ウシ副腎可溶性画分より、硫酸塩析(55~75%), DEAE-Sepharose, Phenyl-Sepharose, TSK-Gel G3000SWゲル濾過によって部分精製した(Fig. 32)。この部分精製したG_bを50 μ M [α -³²P]NAD(1.25 μ mol/pmol of G_b, 1,000cpm/pmol)とボツリヌスC₁毒素(0.125 μ g/pmol of G_b)と共にインキュベートしてG_bを[³²P] ADPリボシル化した。この時、反応はreaction mixture

(100mM Tris · HCl, pH8.0, 10mM thymidine, 10mM dithiothreitol, 10mM nicotinamide, 5mM MgCl₂)中で、30°C、3時間行なった。反応は氷冷によって停止させ、反応液を分子量10,000で分画するCentricon 10(Amicon)を用いて、4°C下で濃縮およびMono Q buffer(20mM Tris · HCl, pH7.8, 5mM MgCl₂, 1mM EDTA, 1mM dithiothreitol, 1μM GDP, 5% ethylene glycol)の添加を繰り返し、未反応の[α-³²P]NADと0.5K KClを除去した。この操作を十分行なった後、最終的に500μlまで濃縮した。次に、このサンプルのMono Q FPLCを行なって残存する[³²P]NAD、C₁ボツリヌス毒素、非ADPリボシル化G_bおよび混在蛋白質を分離し、[³²P]ADPリボシル化G_bを単離精製した(Fig.18)。単離精製ができたことは15%SDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動によって確認し、定量はこのゲル上で分子量22,000に位置するバンドの放射活性より求めた。

3) G_bのプロテアーゼ消化

精製した[³²P]ADPリボシル化G_bはFig. 32に示す酵素消化法による3実験を行なった。また、各プロテアーゼによる消化条件はFig. 33に示した。

実験1は、700μlの10mM CaCl₂を含むMono Q buffer中で、精製した[³²P]ADPリボシル化G_b(73μg, 3.3nmol)に1/100(mol/mol)のトリプシン(33pmol)を添加して、30°C、9時間の消化を行なった。ここで、同量のトリプシンを添加し、さらに9時間消化した。この反応後、サンプルに最終濃度0.1%になるようにトリフルオロ酢酸を添加して酸性とし、Aquapore RP-300(逆相系C₈)カラムを接続したHPLC(Beckman HPLC system Gold)システムを使用して、トリプシンで消化された部分ペプチドを分離した。分離操作は、消化部分ペプチドをカラムに吸着させ、流速0.2ml/minで、初期15分間に0.1%トリフルオロ酢酸含有のクロマト用精製水(solvent A)で洗浄した後、0~54%アセトニトリルのlinear gradientを45分間かけて行なった。ペプチドの溶出パターンは210nmでモニターし、各フラクションは1分毎ごとに回収した。また、各フラクション(200μl)より10μlを採取して放射活性を測定し、放射活性ペプチドの溶出パターンを調べた。この方法によって、4つ

Methods

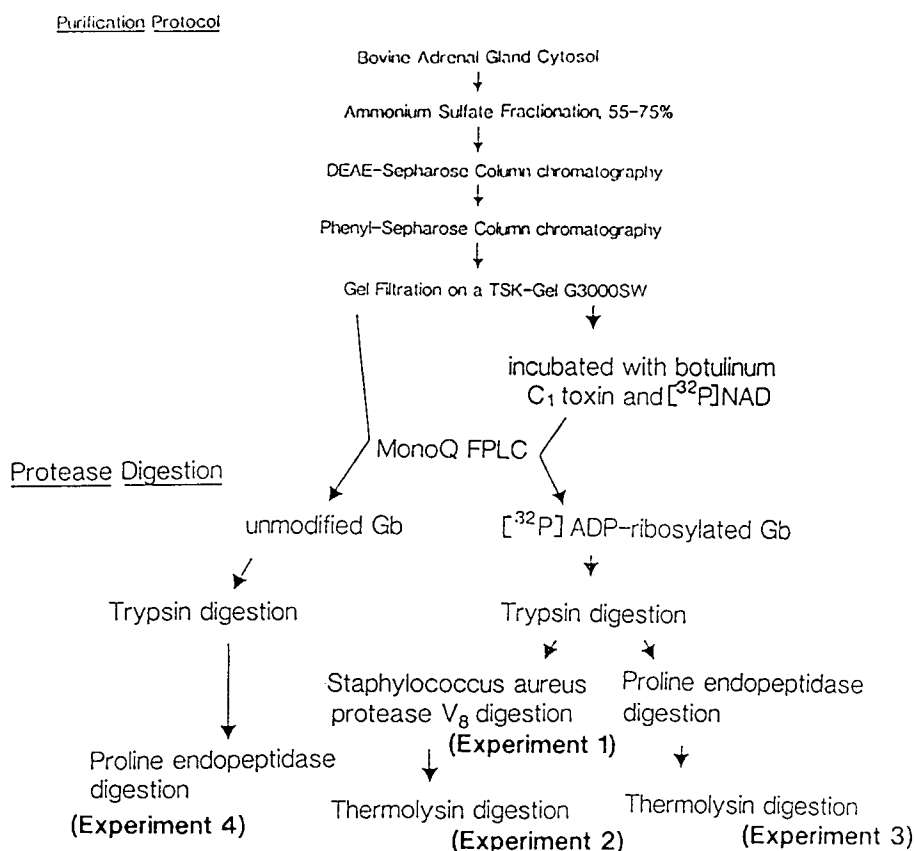


Fig. 32 Purification protocol and protease digestion.

の放射活性を持つピークが得られ、溶出順にtrypsin peak I-IVとした。各放射活性ピークの量はそれぞれ I;0.32nmol, II;0.49nmol, III;0.96nmol, IV;0.84 nmolであった (Fig. 19)。次に、この4つのピークをそれぞれ1/30 (mol/mol)の *Staphylococcus aureus* protease V8 (プロテアーゼV8) (I,II,III,IVそれぞれ 11,16,32,28pmol)で消化した。消化は100mM potassium phosphate, pH7.8緩衝液中で、30°C、8時間行ない、ここで同量のプロテアーゼV8を添加してさらに8時間消化した。この4サンプルは、最終濃度が1%になるようにトリフルオロ酢酸を添加して酸性にした後、消化によって得られたペプチドをHPLCシステムにて分離した。ペプチドの溶出はsolvent Aを15分間流した後、0~60%アセトニトリルのlinear gradientを60分間かけて行なった。その結果、トリプシン消化によって得られた

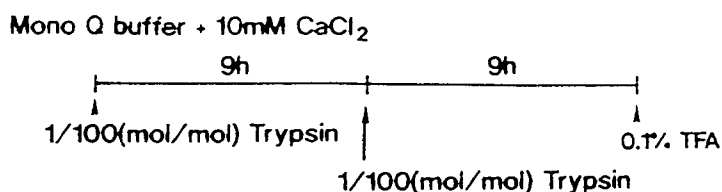
放射活性ペプチド I, II, III, IV の各プロテアーゼ V8 消化によりそれぞれ同じ溶出時間である 30 分目に 0.27nmol, 0.13nmol, 0.95nmol, 0.34nmol の放射活性を持つ単一なピークが回収された (Fig. 20)。これらの 4 つの放射活性ペプチドのアミノ酸配列は、automated pulse-liquid phase protein sequenator (Applied Bio-systems, model 477A) および on-line phenylthiohydantoin derivative analyzer (Applied Bio-systems, model 120A) によって決定した。

実験 2 は、別に用意した $[^{32}\text{P}]$ ADP リボシル化 G_b (79 μg , 3.6nmol) を実験 1 に従ってトリプシン消化し、得られた 4 つの放射活性ペプチドを含むフラクションを混合した。このサンプルをさらに実験 1 に従って 1/30 (mol/mol) のプロテアーゼ V8 にて消化し、HPLC でペプチドの分離を行ない、3.4nmol の単一な放射活性ピークを回収した。この一部 (0.69nmol) をさらに 1/100 (mol/mol) 量の thermolysin (サーモリシン) にて、20mM Tris \cdot HCl, pH 7.8, 10 mM CaCl_2 中で、30°C、3 時間消化した。この消化によって得られた部分ペプチドの一部 (0.25nmol) を用いて Spheri 5RP-18 カラム (逆相系 C_{18} カラム) を接続した HPLC システムによるクロマトグラフィーを行なうと、以下の溶出条件において溶出時間 24 分目に単一な放射活性ピーク (90pmol) として回収された。この放射活性ペプチドのアミノ酸配列を決定した。この時の溶出条件は 15 分間 solvent A を流し、0~60% アセトニトリルの linear gradient を 60 分間かけて行なった。

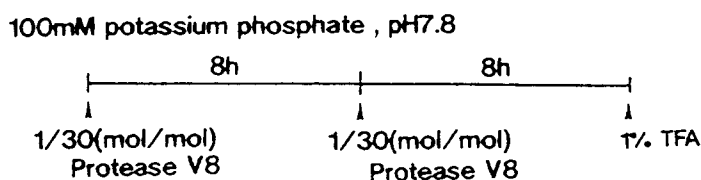
実験 3 は、別に用意した $[^{32}\text{P}]$ ADP リボシル化 G_b (55 μg , 2.5nmol) を実験 1 に従いトリプシンにて消化し、HPLC 分離によって 4 つの放射活性ペプチドを回収し、混合した (1.9nmol, 42 μg)。これを 1/20 (weight/weight) のプロリンエンドペプチダーゼで、100mM potassium phosphate, pH 7.0 中で、30°C、8 時間の消化を行ない、その後、同量のプロリンエンドペプチダーゼを添加し、さらに 8 時間消化を行なった。ここで得られた部分ペプチドは、Aquapore RP-300 カラムを接続した HPLC システムにて分離した。この時の溶出条件は、solvent A を 15 分間流した後に、0~50% アセトニトリルの linear gradient を 45 分間かけて行なった。その結果、溶出時間 32 分目に 0.95nmol の単一な放射活性ピークを得た。この放射活性ペプチド

をさらに実験 2 に従いサーモリシンにて消化し、Spheri 5RP-18カラムを接続した HPLCシステムによってその部分ペプチドを分離すると、溶出時間48分目に0.36 nmolの単一な放射活性ピークが溶出された。このペプチドのアミノ酸配列を決定した。

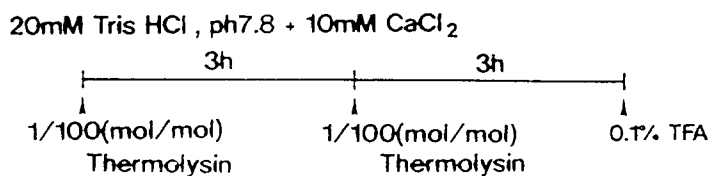
Trypsin Digestion



Protease V8 Digestion



Thermolysin Digestion



Proline endopeptidase Digestion

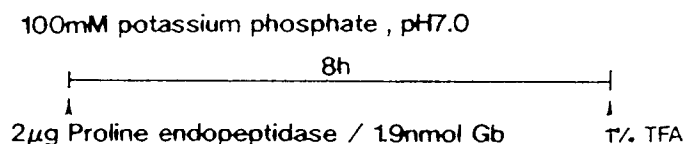


Fig. 33 Method of protease digestion.

実験4では、ADPリボシル化していない精製G_b(70 μ g, 3.2nmol)を32pmolのトリプシンで9時間ごとに2回消化した。これを、実験1と同様にHPLCにて分離し、ADPリボース結合付近の構造を含むペプチドを検索した。このアミノ酸配列を含むペプチドをさらに1 μ gのプロリンエンドペプチダーゼにて消化した。この反応液を酸性とし、HPLCシステムによって分離し、 $[^{32}\text{P}]$ ADPリボシル化ペプチドと一致する非修飾G_b由来のペプチドを検索した。方法は、いずれも実験3に従った。

4) G_bとADPリボース結合の中性ヒドロキシルアミンでの安定性

Hiltzら[50,51], Hsiaら[52], Ogataら[53,54]はADPリボースとその基質蛋白質との結合は中性ヒドロキシルアミン中での安定性の違いによって分類されることを報告している(Fig. 30)。この方法に従いG_bとADPリボースの結合安定性を調べた。方法は、精製した $[^{32}\text{P}]$ ADPリボシル化G_b(200pmol, 630cpm/pmol)を、用時調製した0.5M hydroxylamineを含む50mM Hepes \cdot NaOH, pH7.5のbuffer中で、全量2mlにして37°Cでインキュベートした。この反応液から0, 0.5, 1.0, 1.5, 2.0, 3.0, 4.0, 5.0時間に各200 μ lを採取し、それぞれに氷冷下で0.02%コール酸ナトリウム400 μ lと24%トリクロロ酢酸200 μ lを添加した。この操作によって得られた沈澱をLaemmli sample bufferに再溶解し、15% SDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動を行ない、分子量22,000のバンドの放射活性をPackard Minaxi model liquid scintillation counterで測定した。コントロールは0.5M hydroxylamineの代わりに0.5M NaClを用いて、上記実験と同様に、かつ、0.5M hydroxylamine添加実験と平行して行ない、この条件下でも分解されない $[^{32}\text{P}]$ ADPリボシル化G_b量を100%として、0.5M hydroxylamine中での安定性をRatio(hydroxylamine/NaCl)として求めた。

5) $[^{35}\text{S}]$ GTP γ S結合能に及ぼすADPリボシル化の影響

精製したG_b(48pmol)を2本用意し、一方に57 μ gのボツリヌスC₁毒素を(AD

Pリボシル化)、もう一方にはその溶媒を(コントロール)添加し、それぞれ全量160 μ lの70 μ M NADを含む100mM Tris HCl, pH8.0, 10mM dithiothreitol, 5mM $MgCl_2$ 中で、30°C、1時間のインキュベートを行なった。このサンプルは第2章に従い、全量400 μ lで最終濃度20mM Tris \cdot HCl, pH8.0, 100mM NaCl, 30mM $MgCl_2$, 1mM EDTA, 5mM dithiothreitol, 1 μ M [^{35}S]GTP γ S (20 Ci/mmol)になるような反応液中に添加し、30°Cでインキュベートした。反応開始後、0, 0.5, 1, 2, 4, 6, 12時間に各50 μ lを採取し、BA85メンブランフィルターアッセイにて[^{35}S]GTP γ S結合量(GTP γ S結合型G_b)を測定した。

6) GTPase活性に及ぼすADPリボシル化の影響

Brandtらの方法に従って行なった[75]。精製したG_b(42pmol)を2本用意し、一方に50 μ gのボツリヌスC₁毒素(ADPリボシル化)を、もう一方にはその溶媒(コントロール)を添加し、それぞれ全量140 μ lの70 μ M NADを含む100mM Tris \cdot HCl, pH8.0, 10mM dithiothreitol, 5mM $MgCl_2$ 中で、30°C、1時間の反応を行なった。これを全量700 μ lで、最終濃度が1 μ M [γ - ^{32}P]GTPになるように調製した50mM Hepes \cdot NaOH, pH8.0, 0.5mM $MgCl_2$, 100mM NaCl, 0.25mM 5'-adenylyl-imidodiphosphate, 5mM dithiothreitol中で、37°Cでインキュベートした。反応開始後、0, 30, 60, 90分後にそれぞれ100 μ lずつ採取し、予め氷冷しておいた900 μ lの0.7M perchloric acid, 25mM KH_2PO_4 , 5% Norit液を加えて30分間氷冷した後、2,500 x gで20分間遠心した。遠心後、この反応液の上清500 μ lを採取し、GTPase活性によって水解されて放出された[^{32}P]リン酸の量をトライトン \cdot トルエンシンチレーター中で測定した。

7) G_b(rho遺伝子産物)特異的GAP蛋白質(GTPase activating protein)の部分精製とGAP活性に及ぼすADPリボシル化の影響について

rho特異的GAP蛋白質はウシ副腎より部分精製した。-80°Cで凍結した標本212gをハサミで細分し、その切片を640mlのhomogenizing buffer (20mM Tris \cdot HCl, pH

7.5, 5mM MgCl₂, 1mM dithiothreitol, 1mM EDTA, 2mM benzamidine hydrochloride, 0.86mM phenylmethylsulfonyl fluoride, 0.25M sucrose)中でワーリングブレンダー、2,500 x rpmで2.5分間およびPotter-Elvehjem homogenizer 3 ストロークにてホモジネートを作製した。そのホモジネートを10,000 x g, 20分間遠心し、その上清をさらに100,000 x g, 1時間遠心分離してその上清570mlを可溶性画分 (cytosol) として保存した。この時、この可溶性画分にGAP活性が多く含まれことを確認した。さらに、この可溶性画分に55%の硫酸(32.6g/100 ml sample)を少量ずつ添加して4°C下で1時間の攪拌を行なった後、10,000 x gで20分間遠心分離した。ここで得られた沈澱(硫酸0~55%画分:AS 0/55)はGAP buffer (20mM Tris · HCl, pH7.5, 5mM MgCl₂, 1mM dithiothreitol, 1mM EDTA, 1 μM GDP, 0.86mM phenylmethylsulfonyl fluoride, 5% ethylene glycol)150mlに溶解させ、同組成のbuffer中で一晩透析を行ない硫酸除去を行なった。また、硫酸55%飽和塩析後の上清(硫酸55~100%画分:AS 55/100)も同様に透析を行なった。透析後この2つの硫酸画分についてGAP活性を調べると、G_b (rho A遺伝子産物)に作用するGAPはAS 0/55画分に多く含有することがわかった(Fig.23)。次に、このAS 0/55画分(221ml)のDEAE-Sepharose カラムクロマトグラフィーを行なった。カラムによる分離条件としては、GAP bufferにて平衡化した直径2.5cm x 高さ20cmのDEAE-Sepharoseカラムにこの硫酸分画に含まれる蛋白質を吸着させ、300mlのGAP bufferにて洗浄後、全量800mlの0~0.3M KClのlinear gradientにて蛋白質の溶出を行なった。この操作により、rho GAP蛋白質は passed through(DEAE GAP-I)と0.08M KCl時(DEAE GAP-II)の2つの画分に分離して溶出された(Fig. 24)。この時、2つに分離したrho特異的GAP蛋白質を含む画分について、含有するras GAP蛋白質の存在の有無を調べた(Fig. 24, Fig. 25A)。また、rhoに作用するGAP蛋白質はras p21に、ras特異的GAP蛋白質はrho遺伝子産物に働かないことを確認する(Fig. 25, Fig. 26)とともに、rho GAPとrasGAP(Mw=120,000)[72,73]の分子量が異なることをTSK-Gel G3000SWゲル濾過を用いて証明した(Fig.27)。方法は、DEAE GAP-II画分(123ml)をCentricon 10を用いて4mlに濃縮した後、その500 μlを

FPLCシステムに接続したTSK-Gel G3000SWカラムを用いて0.5M KClを含むGAP buffer中でゲル濾過を行なった。各フラクションは1.2mlずつ採取し、蛋白質の溶出は280nmでモニターした。rho GAPの分子量は既存の蛋白質の溶出時間より予測した。次に、この部分精製したDEAE GAP-II(rho GAP)を用いて、ADPリボシル化したG_b (rho遺伝子産物) およびADPリボシル化していない (unmodified) G_bのGTPase促進作用 (GAP活性) を比較検討した。

GAP活性はFig. 34に示すように、最終濃度が50mM Na・Phosphate, pH6.8, 0.5 mM EDTA, 0.5mg/ml BSA, 0.5mM dithiothreitol, 0.005% Nacholateのpreequilibration buffer中にG_b 6pmol (6 assay分) と最終濃度0.5 μ M [γ -³²P]GTP(150 Ci/mmol)を添加して全量81 μ lで、30°C、50分間反応させた。この時に結合した [γ -³²P]GTPを100%とする。次に、この [γ -³²P]GTP結合サンプル(1pmol G_b/13.5 μ l)を、部分精製したGAP蛋白質を含む25°Cに保温した最終濃度20mM Hepes・NaOH, pH7.5, 1mM MgCl₂, 0.1mg/ml BSA液に添加して全量306 μ lでインキュベートした。反応は、0, 2.5, 5, 7.5, 10minにそれぞれ51 μ lを採取した後、直ちに氷冷したwashing buffer(20mM Tris・HCl, pH7.5, 5mM MgCl₂, 100mM NaCl, 0.1mM GTP)を添加することで反応を停止させ、各時間に残存する [γ -³²P]GTP結合型G_b量をBA85メンブランフィルターアッセイ法によって定量し、GTPase促進活性 (γ 位の³²Pi基がGAPによる水解促進作用によって脱リン酸化され、 [γ -³²P]GTP結合型G_b量が減少すること) を測定した。また、GAPによってGTP結合型G_bが水解されてGDP結合型G_bになることは、 [γ -³²P]GTPの代わりに [α -³²P]GTPを用いて確認した。

G T P b i n d i n g

Preequilibration buffer	6.75 μ l
(100mM Na · Phosphate, pH6.8, 1mMEDTA, 1mg/ml BSA, 1mM dithiothreitol, 0.01% Nacholate)	
Gb(rho A gene product) or c-ras p21(1pmol/ μ l)	1 μ l
0.5 μ M [γ - 32 P]GTP(150 Ci/mmol) or 0.5 μ M [α - 32 P]GTP(150 Ci/mmol)	1.35 μ l
H ₂ O	4.4 μ l

GTP-binding reaction mixture : 13.5 μ l /assay

▼
incubated at 30°C for 50min

▼
5mM GTP(1.5 μ l) added to GTP-binding reaction mixture

G T P a s e a c t i v i t y

GTP-binding reaction mixture	15 μ l
200mM Hepes · NaOH, pH7.5, 10mM MgCl ₂	4.5 μ l
1mg/ml BSA	1.5 μ l
DEAE GAP-I, GAP-II(rho GAP) or c-ras GAP	X μ l
DEAE buffer	30-X μ l

51 μ l/assay

▼
The reaction was quenched by the addition of 2ml of ice cold Washing
buffer (25mM Tris · HCl, pH7.5, 10mM MgCl₂, 0.1mM GTP).

▼
Filtered under vaccum through a BA-85 membrane
(washed 6 times with 2ml of the Washing buffer)

▼
The filter-bound radioactivity was determined

Fig. 34 GAP assay

結 語

分子量約20,000~30,000の低分子量G蛋白質の存在が次々に明らかにされ、現在では約30種の低分子量G蛋白質(ras, Krev, rho, rac, ral, rab, ypt, sec, arf等)の存在が報告されている。これらの低分子量G蛋白質が制御する情報伝達経路はほとんど明らかにされていないが、これら低分子量G蛋白質による情報伝達はこの蛋白質に結合するGDPがGTPに交換されることによって活性化(onスイッチ)され、不活化(offスイッチ)はそのGTPの水解(GTPase)活性によって行なわれていると考えられている。その情報伝達系の制御はヘテロ3量体の場合(Fig. 3)とは異なり、 α サブユニットに相当する単体のみで行なうことができ、 $\beta\gamma$ サブユニットを持たないことがその特徴である。また、GDP/GTP交換反応は、GTP/GDP交換促進因子(GDS: GDP dissociation stimulator)[76-80]やGTP/GDP交換抑制因子(GDI: GDP dissociation inhibitor)[76]によって調節されていて、offスイッチはGTP結合型G蛋白質自身が持つGTPase活性と、そのGTPase活性を数100倍に上昇させるGAP(GTPase activating protein)[68,71]によって調節されている。このことも低分子量G蛋白質の特徴であり、これらの調節因子はそれぞれ固有な低分子量G蛋白質を認識するものが明らかにされている。一般的に、正常な情報伝達ではGTP結合型G蛋白質は速やかにGAPによって水解されてGDP結合型になり、活性型G蛋白質を一定量以上あるいは長期に渡って保持することはないと考えられている。それ故、G蛋白質そのものの異常や調節因子の異常が正常な情報伝達を変化させ、ある種の疾患を誘発すると考えられている(後述)。この他に、これらの低分子量G蛋白質が機能するためには、細胞質から細胞膜やあるいは細胞内小器官の膜への移行が必要であるが、この移行は脂質結合やメチル化によって制御されている。特に脂質結合は重要で、コレステロール合成経路の中間体であるファルネシルピロリン酸由来のファルネシル基をファルネシルトランスフェラーゼ[81-83]の働きによって低分子量G蛋白質のカルボキシ末端のCystein残基に付加[84,85]するタイプとゲラニルピロリン酸由来のゲラニルゲラニル基をゲラニルゲラニルトランスフェラーゼの働きによって転移する[86,

g1]タイプが知られている。これらの代表としては、前者はras p21であり、後者はrho遺伝子産物である。共に、脂質を結合した後にはこのCysteinよりもさらにカルボキシ末端側に位置する2~3アミノ酸残基を脱落させ、このCystein残基のカルボキシル基のメチル化[88,89]やさらにこのCystein残基よりもわずかにアミノ末端側に位置するCystein残基へのパルミチン酸転移[85]が起こり、標的となる器官の膜へ移行することが証明されている。現在、ガン発現に働くと考えられているras p21の点変異体を作作用させない目的で、ファルネシルトランスフェラーゼの阻害剤の開発が試みられていることも興味深い。さて、これらの機能はその1次構造的な特徴からも明らかにされていて、組換え体を用いた実験からFig. 35に示したras p21の1次構造にみられるような5つのGTP/GDP結合およびGTPase活性に関する領域（ドメイン）と脂質結合ドメインを持ち[28,90]、低分子量G蛋白質は互いにこれらのドメインに高い相同性が保持されている。また、ある種の情報を受け取った低分子量G蛋白

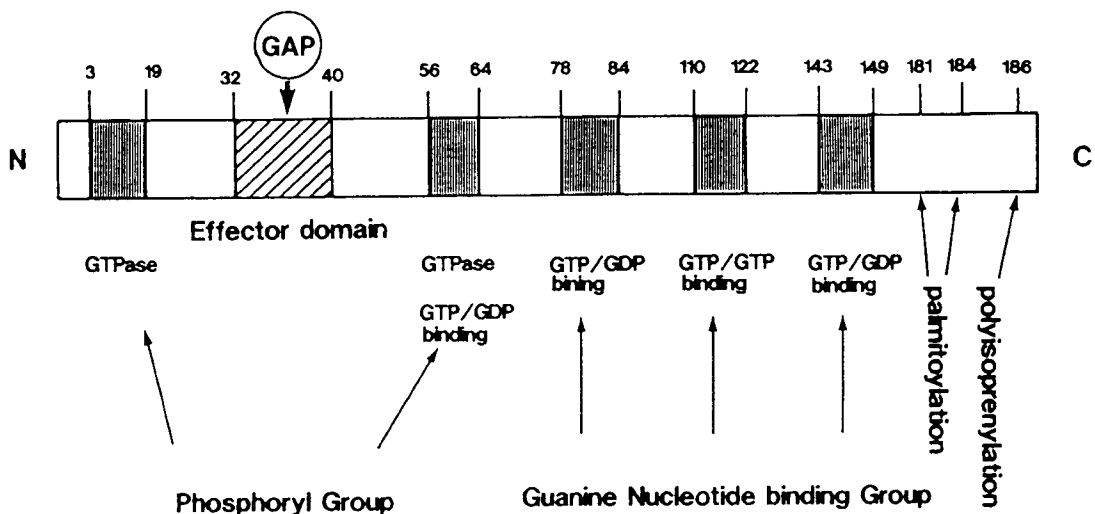


Fig.35 Structure of ras p21.

白質は、その情報伝達系において下流に位置する標的因子（エフェクター）に情報を伝達することが予想されていて、エフェクタードメインのアミノ酸配列の相同性によって約30種の低分子量G蛋白質はいくつかのタイプに分類でき、同一のエフェクタードメインを持つG蛋白質同士がネットワークを構成して情報伝達系を複雑に制御しているものと考えられている。現在、最も研究が進んでいるのはras p21で、他の低分子量G蛋白質の機能解明のための重要な手がかりとなる。この蛋白質は、細胞の分化や増殖活性を持ち、癌化した細胞の2割位からその点突然変異体(point mutant)が確認されていることから癌化に関わる重要な因子であり、その機能の解明が急がれている。この蛋白質が癌遺伝子産物であると推定された発端は、癌細胞からその点変異体が検出されたため、K-rasではコドン12のGlycine残基がSerine、Cystein、Valine、Arginine、Alanine残基に点変異したもの、H,N-rasではコドン61のGlutamine残基がLysine、Arginine、Leusine、Histidine残基に点変異したもの、また、N-rasでは低頻度ではあるがコドン13、117、146の点変異体等が発見されている。このうち、高頻度で発見されるras p21点変異体はコドン（アミノ末端より）12、61の点変異体である。立体構造的な解析においては、¹²Glycine残基はGTPのβ位のリン酸基が、⁶¹Glutamic acid残基はGTPのγ位のリン酸基が、³⁰Asparagine残基はリボース部分が、¹⁴⁵Serine～¹⁴⁷Lysineおよび¹¹⁶Asparagine～¹²⁰Leusine残基にはグワニン環が結合すると考えられていて、ras p21の点変異はすべてこれらのGDP/GTP結合およびGTPase活性に関与するアミノ酸配列上に起こっている[27,91,92]。そのため、癌細胞から検出された点変異体は不活化を促進するGAPによる影響を受けず、活性型であるGTP結合型が常に保持されている。その結果、GTP結合型ras p21の持つ細胞増殖あるいは分化シグナルが長時間継続されて癌化するものと説明されている。また、このGTP結合型ras p21が増殖や分化活性を示すような活性型であることは、ras p21を細胞にマイクロインジェクションする際にGTPの非水解型のアナログを結合させた場合のみ細胞の分化や増殖を惹起すること[68]、癌組織より検出される変異ras p21はGTP結合型を保持すること[68]、また、種々の成長因子で細胞の分化や増殖を惹起する際、これに応答して細胞内のGTP結合型ras p21が上昇す

ること[93,94]等によって証明されている。一方、ras p21を調節する因子についてみると、onスイッチではras GDSとそれと類似の性質を持つCDC25[95,96]、SCD25[97]が同定されていて、GDIの存在は知られていない。offスイッチはras GAPによって調節されている。ras GAPはウシの脳より精製され[70]、クローニングによりその1次構造が明らかにされていて[71,72]、その遺伝子のコードする分子量約120,000の蛋白質のC末端側にはGTPase活性を促進する領域を持ち、N末端側はその調節領域であると想定されていて、その中には癌遺伝子でチロシンキナーゼとして知られるsrcとの相同性が認められる。成長因子であるPDGFやEGFによって線維芽細胞を刺激するとチロシンリン酸化されたGAPは分子量62,000(p62)と190,000(p190)の蛋白質との複合体形成やsrcファミリーに属するチロシンキナーゼ蛋白質との共役を伴い、PDGFやEGFレセプターに結合する[98,99]。また、同様にsrc遺伝子産物でトランスフォームした細胞でもGAPはこのp62とp190の蛋白質と複合体を形成する[100,101]。このチロシンリン酸化とそれに伴う複合体形成の過程でGAPはそのGTPase促進活性が抑制され、GTP結合型ras p21が上昇すると考えられている[93,102]。それ故、ras p21はPDGF、EGFおよびsrc遺伝子産物の下流に位置[103,104]し、PDGF,EGFレセプター刺激→チロシンキナーゼ(src様複合体形成)活性化→GAP活性の低下→ras p21活性化→エフェクターという情報伝達系によって制御されていることが最近明らかにされた。さらに、このp62とp190の蛋白質はその1次構造が決定されていて[105,106]、特にp190の蛋白質はN末端側から順にGTPase、GFR-1(glucocorticoid receptor repression factor:グルココルチコイドレセプター遺伝子発現調節因子)、白血病に関わるBCR遺伝子との相同性を示した。BCR遺伝子は白血病においてABL癌遺伝子が染色体組換えにより融合している遺伝子として同定されたもので、低分子量G蛋白質であるrac遺伝子産物[107,108]に特異的に作用するrac GAP[109]の部分アミノ酸配列と相同性を持つ。このrac遺伝子産物はrho遺伝子産物と高い相同性を示し、しかも共通するエフェクタードメインを持つことから、同一の情報伝達を調節することが想定されている蛋白質である。それ故、ras p21とrho/racがクロストークしている可能性がある。また、p62の蛋白質はRNA結合とGAP結合に関与する構造を

持ち、mRNAの代謝、スプライシング、翻訳調節等を調節する可能性が示唆されている。一方、皮膚神経線維腫やシュワン細胞の異常増殖が認められる遺伝子疾患に関わる因子として、2818のアミノ酸をコードするNF1(neurofibromatosis type1:I型神経線維腫)遺伝子の存在が最近明らかにされた[110]。この蛋白質の構造中には、ras GAPや酵母RASに対するGTPase促進活性を持つIRAと相同性を示す領域が認められる[110,111]。そこで、XuらはNF1のGAP相同領域の遺伝子を細胞に発現してGAP活性の有無について検討し、ras p21のGTPase活性を特異的に促進することを明らかにした[111]。さらに、大腸腺癌、脊椎形成異常にみられる腫瘍、退行性星細胞腫においてNF1遺伝子のras GAP相同領域のLysine残基(N末端より1423番目)がGlutamateあるいはGlutamic acid残基に変異した遺伝子が検出され[112]、その変異NF1によるras p21のGTPase促進活性は正常なNF1の1/100以下に低下しているためGTP結合型ras p21量は増加していたという。また、シュワン細胞の癌から株化してNF1含量を調べたところ、その発現が著しく低下していて、GTP結合型ras p21量が増大していたという[113]。この時、ras GAPの発現は正常であったという結果から考えると、ras p21に変異がなく、またras GAPが正常に発現していてもNF1遺伝子の異常によりras p21情報伝達系が活性化されるということである。このことより、ras p21によって制御される第2の情報伝達系である未知刺激→NF1抑制→ras p21活性化→エフェクターが存在することになる。もう1つの興味深い所見は、癌細胞の正常復帰に関与する因子(リパータント)として同定されたKrev-1 p21(rap-1,smg p21と一致)遺伝子[114,115,116]の知見についてである。この遺伝子によってコードされる蛋白質はras p21と約50%の相同性を持ち、GDP/GTP結合活性およびGTPase活性ドメインに高い一致が認められ、特にエフェクタードメインはras p21と完全に一致することから同じエフェクターを認識することが推定されている。癌細胞から検出されたras p21の変異体の1つに⁶¹Glutamineが⁶¹Threonine[117]に変化したものが知られていて、この変異体はGAPによるGTPase促進活性を受けないことが報告されている。Krev-1 p21ではもともとここに位置するアミノ酸残基はThreonineであるので、この点変異ras p21と同じようにras GAPとは強く結合するが、結合してもGTPase促進活性を受

けない[118,119]。また、ras p21に作用しないKrev-1 p21に特異的に作用するGAPのcDNAがクローニングされているがras GAPとは全く違った構造を持ち、ras GAPが作用すると言われているエフェクタードメインとは別の部位に作用することが予測されている。また、K-ras p21変異が多く見いだされる大腸癌の制限酵素断片ポリモルフィズムにおいて、Krev-1遺伝子領域のloss of heterozygosityの症例が報告され、Krev-1失活に関わるメカニズムが予測された[120]。このことから、第3の情報伝達系である未知刺激→Krev-1失活→ras p21の活性化→エフェクターが想定される。上記した3つの情報伝達系の他に、さらに、未知刺激→GDS活性化→GDP/GTP交換反応促進→ras p21活性化→エフェクターの可能性も残されていて、これらの情報伝達経路が複雑なネットワークを形成していると考えられる(Fig. 36)。上記したようにras p21の活性化機構は複雑であるが、ras p21の調節する情報伝達のすべてがGTP結合型ras p21の上昇およびそのエフェクターの刺激に集約される。つまり、活性型ras p21の関与する発癌機構を知るためには、ras p21の下流域の情報伝達経路を明確にする必要があると考えられる。最近、ras p21がMAP(microtubule-associated

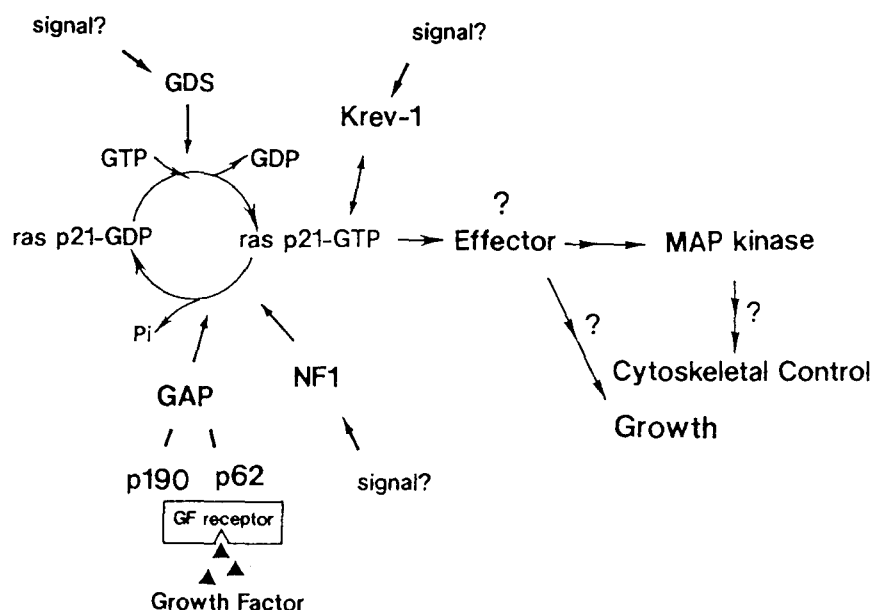


Fig. 36 Signal transduction of ras p21

proteinあるいはmitogen-activated protein)キナーゼ活性を調節することが解明され[121]、ras p21の下流に位置する因子が初めて同定された。ras p21によるMAPキナーゼの活性化はin vitroでは観察されないことから、ras p21はいくつかの未知なステップを経てMAPキナーゼを活性化することが予想され、MAPキナーゼはエフェクター分子ではないことが示唆された。ところで、細胞骨格の1つである微小管は α -、 β -チューブリンによって構成されるが、MAPキナーゼはこのチューブリン重合を活性化する。このことから、ras p21が細胞骨格形成に関与することが示唆され、活性型ras p21による発癌機構や細胞の増殖、分化は、細胞骨格の異常による結果かもしれない。これらの現象を解明するためには、ras p21の標的となるエフェクター分子を明らかにし、ras p21の正常な情報伝達から癌化シグナルへのスイッチをエフェクター分子の活性化で測ることが重要である。また、MAPキナーゼを活性化する因子（但し、ras p21とその調節因子以外）の少なくとも1つはエフェクター分子であることから、MAPキナーゼはエフェクター分子同定のための有用なプローブであると考えられる。

一方、G_b (rho遺伝子産物)はras p21と35%の相同性を示し、特にGTP/GDP結合活性やGTPase活性に関与するドメインに高い相同性が認められ、ras p21のG蛋白質としての機能をrho遺伝子産物もまた保持している。活性型rho遺伝子産物への移行はGTP/GDP交換反応によるが、この反応はrho遺伝子産物に特異的に作用するrho GDI[122]やrho GDS[123]によって調節され、offスイッチはrho GAP[124,125]によって調節されていて、ras p21と類似している。後に、同研究グループのMoriiらはこのrho GAPの単離精製に成功し、この蛋白質が分子量28,000であり、分子量120,000のras GAPとは明らかに異なることを報告した。rho GAPの構造は明らかにされていないが、成長因子刺激→ras GAP抑制→ras p21活性化という情報伝達経路が示唆されていることから考えると、rho遺伝子産物の調節する情報伝達系の上流域はras p21とは異なり、また、エフェクター領域もras p21とは異なるので、制御する情報伝達系はras p21とは違うものと思われる。エフェクター領域においてrho遺伝子産物と高い相同性を持つG蛋白質として知られているものは現在のところrac遺伝子産

物(Fig. 37)とG25K(CDC42Hs)であり、これらの蛋白質が複雑な調節を行なっていると考えられる。ところで、Diekmannらはrho GAPの部分アミノ酸配列を単離し、ホモロジー検索からこの配列がBCR蛋白質のカルボキシ末端の配列との相同性を持つことを明らかにした。そこで、彼らは、このBCR蛋白質のカルボキシ末端領域部分を大腸菌に作らせてそのGAP活性を調べてみると、rhoではなくrac遺伝子産物に対するGAP活性が認められたという[109]。このBCR遺伝子は内部切断とABL遺伝子の転座によってキメラ遺伝子であるBCR-ABLを形成し、白血病と深い関わりを持つことが予想されているが、その機能は不明である。rac遺伝子産物やrac GAPが白血病発症に関与するか否かは現在のところ未知であるが、この見地からrac遺伝子産物の制御する情報伝達を調べ、エフェクター分子におけるrho遺伝子産物とのクロストークやrho GAPの1次構造を明らかにしてrac GAPとの相同性を調べることは重要であると考えられる。

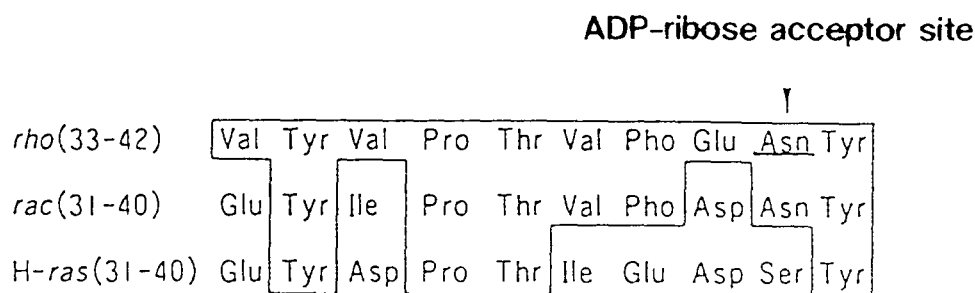


Fig. 37 Effector domain of rho A, rac gene product, and ras p21.

ところで、C₃酵素はracやG25KをADPリボシル化しないことから、現在のところrho遺伝子産物のみを修飾するものと考えられている。そこで、近年この酵素活性を利用してrho遺伝子産物の生理機能の解明が試みられている。例えば、Swiss 3T3線維芽細胞の培養液にC₃酵素を処理すると、処理する酵素の濃度や時間に依存して

細胞の球形化が観察される[126]。この形態変化は、細胞の違いによって感受性が異なるもののNIH3T3細胞、Vero細胞、LLC-MK2細胞、HeLa細胞でも認められた。また、腎尿細管上皮由来のVero細胞をC₃酵素存在下で培養すると、細胞の球形化がとともに、アクチンからなるミクロフィラメントの構築が消失が起こっていることが報告された[127]。さらに、PC-12細胞ではC₃酵素の処理によって、増殖が停止し、成長円錐を持った神経突起の形成が観察される[67]。神経突起の主な細胞骨格構成成分は微小管とニューロフィラメントであるのに対し、成長円錐ではアクチン線維が主体である。一方、Patersonらは¹⁴Glycine残基(ras p21ではコドン12の変異体に相当する)をValineに変換した活性型変異rho遺伝子産物をSwiss 3T3細胞に微量注入すると細胞は突起形成と収縮を起こし、この時、アクチンストレス線維束が観察されるが、微小管系は変化を起こさないことを報告した[128]。これらの報告から、rho遺伝子産物は細胞骨格のうち微小管ではなく、特にミクロフィラメントの構成に関与していると思われる。また、rho遺伝子産物のADPリボシル化は、トロンビンによる血小板凝集や凝集刺激に応じたセロトニン分泌を抑制し、逆に、血小板凝集刺激は細胞内のGTP結合型rho遺伝子産物への変換を促進することが報告された[129]。このことは、rho遺伝子産物のADPリボシル化とGTP結合活性が相反する反応を示すことを意味する。同様に、最近、黄色ブドウ球菌より培養ケラチノサイトの分化を阻害するEDIN(epidermis differentiation inhibitor)と呼ばれる菌体外酵素が同定され、この酵素がC₃酵素の基質蛋白質であるrho遺伝子産物をADPリボシル化することが明らかにされた。Hirataらはウサギ腸間脈動脈をサポニン処理することによって作製したスキンドファイバーにおいてCa²⁺感受性の収縮反応が観察されるが、この反応はGTPγSの添加によって亢進し、EDIN処理によって消失し、さらに、このEDIN処理で消失した反応はGTPγS結合型rho遺伝子産物の添加によって再び回復することを報告した[130]。スキンドファイバーで観察されるCa²⁺-感受性収縮反応のGTP添加による亢進活性はホスファターゼ阻害剤を処理することによって消失することから、rho遺伝子産物はホスファターゼ活性を調節してアクチンミオシン系に働いているのかもしれない。

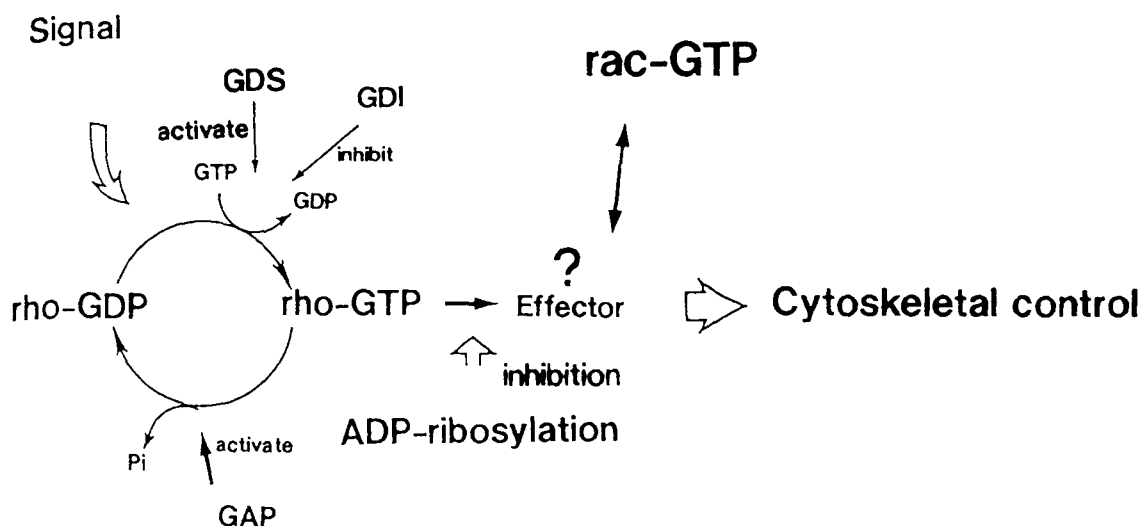


Fig. 38 Proposed scheme of rho-mediated pathway

以上、 G_b (rho遺伝子産物)の調節する情報伝達はFig. 38に示したが、その伝達経路は G_b の周囲を除いては殆ど明らかにされていない。大部分の低分子量G蛋白質でも同様であるが、特にエフェクター分子が同定されている低分子量G蛋白質は殆どなく、そのためのツールも非常に少ない。しかしながら、ras p21で示したように、発症への機作やそのG蛋白質の情報伝達系の解明のためにはエフェクター分子の同定が重要な課題の1つと考えられている。本研究はボツリヌスADPリボシル化酵素反応が G_b のエフェクター分子同定のための有用なツールであることを明らかにしたばかりでなく、 G_b の機能解明およびこの蛋白質による細胞骨格調節、特に細胞内での機構の解明に寄与するものと思われる。

謝 辞

本稿を終わるにあたり、本研究に御懇切な御指導を賜った京都大学薬学部・市川厚教授、京都大学医学部・成宮周教授、並びに武庫川女子大学薬学部・藤原元始教授に心より深甚なる謝意を表します。

また、御多忙な中、本論文を御校閲いただき有益な御助言を賜った京都大学薬学部・川寄敏祐教授、並びに佐藤公道教授に深謝致します。

最後に、本研究の機会を与えて下さいました富士レビオ株式会社 前会長・藤田光一郎博士、同 社長・福山勝博士、同 中央研究所所長・笠原靖博士、同 医薬研究所所長・大西治夫博士、同 薬理研究部長・山浦哲明博士に心より感謝致します。また、本研究の遂行に際し、御協力を戴いた京都大学医学部薬理学教室の研究室員の皆様方、発表に際し、御助言と御協力を戴きました京都大学薬学部衛生化学教室の研究室員の皆様方、並びに富士レビオ株式会社研究所所員の皆様方の御協力に感謝致します。

引 用 文 献

1. Sakaguchi, G. (1983) *Pharmacol. Ther.* 19, 165-194
2. Simpson, L. L. (1981) *Pharmacol. Rev.* 33, 155-188
3. Simpson, L. L. (1986) *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* 26, 427-253
4. Ueda, K., and Hayaishi, O. (1985) *Annu. Rev. Biochem.* 54, 73-100
5. Hayaishi, O., and Ueda, K. (1977) *Annu. Rev. Biochem.* 46, 95-116
6. Hayaishi, O., and Ueda, K. (1982) *Biology and Medicine* New York: Academic 698pp
7. Wold, F. (1981) *Annu. Rev. Biochem.* 50, 783-814
8. Ohashi, Y., and Narumiya, S. (1987) *J. Biol. Chem.* 262, 1430-1433
9. Ohashi, Y., Kamiya, T., Fujiwara, M., and Narumiya, S. (1987) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 142, 1032-1038
10. Matsuoka, I., Syuto, B., Kurihara, K., and Kubo, S. (1987) *FEBS Lett.* 216, 295-299
11. Adam-Vizi, V., Knight, D., and Hall, A. (1987) *Nature* 328, 581
12. Rösener, S., Chhatwal, G. S., and Aktories, K. (1987) *FEBS Lett.* 224, 38-42
13. Morii, N., Ohashi, Y., Nemoto, Y., Fujiwara, M., Ohnishi, Y., Nishiki, T., Kamata, Y., Kozaki, S., Narumiya, S., and Sakaguchi, G. (1990) *J. Biochem.* 107, 769-775
14. Adam-Vizi, V., Rösener, S., Aktories, K., and Knight, D. E. (1988) *FEBS Lett.* 238, 277-280
15. Honjyo, T., Nishizuka, Y., Hayaishi, O., and Kato, I. (1968) *J. Biol. Chem.* 243, 3553-3555
16. Iglewski, B. H., and Kabat, D. (1975) *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 72,

2284-2288

17. Cassel,D.,and Pfeuffer,T. (1978) Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 75, 2669-2673
18. Gill,D.M.,and Mersen,R. (1978) Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 75, 3050-3054
19. Abood,M.E.,Hurley,J.B.,Pappone,M.-C.,Bourne,H.R.,and Stryer,L. (1982) J. Biol. Chem. 257, 10540-10543
20. Moss,J.,and Richardson,S.H. (1978) J. Clin. Invest. 62, 281-285
21. Katada,T.,and Ui,M. (1982) Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 79, 3129-3133
22. Gilman,A.G. (1987) Annu. Rev. Biochem. 56, 615-649
23. Kahn,R.A.,and Gilman,A.G. (1984) J. Biol. Chem. 259, 6235-6240
24. Van Dop,C.,Yamanaka,G.,Steinberg,F.,Sekura,R.D.,Manclark,C.R., Stryer,L.,and Bourne,H.R. (1984) J. Biol. Chem. 259, 23-26
25. Okajima,F.,Katada,T.,and Ui,M. (1985) J. Biol. Chem. 260, 6761-6768
26. Kahn,R.A.,and Gilman,A.G. (1986) J. Biol. Chem. 261,7906-7911
27. Barbacid,M. (1987) Annu. Rev. Biochem. 56, 779-827
28. Evans,T.,Brown,M.L.,Fraser,E.D.,and Northup,J.K. (1986) J. Biol. Chem. 261, 7052-7059
29. Narumiya,S.,Morii,N.,Ohno,K.,Ohashi,Y.,and Fujiwara,M. (1988) Biochem. Biophys. Res. Commun. 150, 1122-1130
30. Furth,M.E.,Davis,L.J.,Fleurdelys,B.,and Scolnick,E.M. (1982) J. Virol. (1982) 43, 294-304
31. Glowinski,J.,and Iversen,L.L. (1966) J. Neurochem. 13, 655-669
32. Narumiya,S.,Ogorochi,T.,Nakao,K.,and Hayaishi,O. (1982) Life Sci. 31, 2093-2103
33. Bensadoun,A.,and Weinstein,D. (1976) Anal. Biochem. 70, 241-250

34. Laemmli, U.K. (1970) *Nature* 227, 680-685
35. Northup, J.K., Smigel, M.D., and Gilman, A.G. (1982) *J. Biol. Chem.* 257, 11416-11423
36. O'Farrel, P.H. (1975) *J. Biol. Chem.* 250, 4007-4021
37. Righetti, P.G., and Drysdale, J.W. (1974) *J. Chromatogr.* 98, 271-321
38. Bradford, M.M. (1976) *Anal. Biochem.* 72, 248-354
39. Chardin, P., Madaule, P., and Tavitian, A. (1988) *Nucleic Acids Res.* 16, 2712
40. Madaule, P., and Axel, R. (1985) *Cell* 41, 31-40
41. Ogorochi, T., Nemoto, Y., Nakajima, M., Nakamura, E., Fujiwara, M., and Narumiya, S. (1989) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 163, 1175-1181
42. Madaule, P., Axel, R., and Myers, A.M. (1987) *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 84, 779-783
43. Rubin, E.J., Gill, D.M., Boquet, P., and Popoff, M.R. (1988) *Mol. Cell Biol.* 8, 418-426
44. Salminen, A., and Novick, P.J. (1987) *Cell* 49, 527-538
45. Walworth, N.C., Goud, B., Kabcenell, A.K., and Novick, P.J. (1989) *EMBO J.* 8, 1685-1693
46. Segev, N., Mulholland, J., and Botstein, D. (1988) *Cell* 52, 915-924
47. Schmitt, H.D., Puzicha, M., and Gallwitz, D. (1988) *Cell* 53, 635-647
48. Goud, B., Zahraoui, A., Tavitian, A., and Saraste, J. (1990) *Nature* 345, 553-556
49. Segev, N., Mulholland, J., and Botstein, D. (1988) *Cell* 52, 915-924
50. Hilz, H. (1981) *Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem.* 362, 1415-1425
51. Bredehorst, R., Wielckens, K., Adamietz, P., Steinhagen-Thiessen, E., and Hilz, H. (1981) *Eur. J. Biochem.* 120, 267-274
52. Hsia, J.A., Tsai, S.-C., Adamik, R., Yost, D.A., Hewlett, E.L., and Moss, J.

- (1985) J. Biol. Chem. 260, 16187-16191
53. Ogata,N.,Ueda,K.,and Hayaishi,O. (1980) J. Biol. Chem. 255, 7610-7615
54. Ogata,N.,Ueda,K.,Kagamiyama H.,and Hayaishi,O. (1980) J. Biol. Chem. 255, 7616-7620
55. Collier,R.J. (1967) J. Mol. Biol. 25, 83-89
56. Van Ness,B.G.,Howard,J.B.,and Bodley,J.W. (1980) J. Biol. Chem. 255, 10717-10720
57. West,R.E.,Jr.,Moss,J.,Vaughan,M.,Liu,T.,and Liu,T.-Y. (1985) J. Biol. Chem. 260, 14428-14430
58. Van Dop,C.,Tsubokawa,M.,Bourne,H.R.,and Ramachandran,J. (1984) J. Biol. Chem. 259, 696-698
59. Vandekerckhove,J.,Schering,B.,Barmann,M.,and Aktories,K. (1988) J. Biol. Chem. 263,696-700
60. Aktories,K.,Barmann,M.,Ohishi,I.,Tsuyama,S.,Jakobs,K.H.,Harbermann,E. (1986) Nature 322, 390-392
61. Ohishi,I., and Tsuyama,S. (1986) Biochem. Biophys. Res. Commun. 136, 802-806
62. Aktories,K.,Just,I.,and Rosenthal,W. (1988) Biochem. Biophys. Res. Commun. 156, 361-367
63. Mohr,C.,Just,I.,Hall,A.,and Aktories,K. (1990) FEBS Lett. 275, 168-172
64. Sigal,I.S.,Gibbs,J.B.,D'Alonzo,J.S.,and Scolnick,E.M. (1986) Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 83, 4725-4729
65. Schlichting,I.,Almo,S.C.,Rapp,G.,Wilson,K.,Petratos,K.,Lentfer,A.,Wittinghofer,A.,Kabsch,W.,Pai,E.F.,Petsko,G.A.,and Goody,R.S. (1990) Nature 345, 309-314

66. De Vos, A.M., Tong, L., Milburn, M.J., Matias, P.M., Jancarik, J., Noguchi, S., Nishimura, S., Miura, K., Ohtsuka, E., and Kim, S. (1988) *Science* 239, 888-893
67. Nishiki, T., Narumiya, S., Morii, N., Yamamoto, M., Fujiwara, M., Kamata, Y., Sakaguchi, G., and Kozaki, S. (1990) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 167, 265-272
68. Trahey, M., and McCormick, F. (1987) *Science* 238, 542-545
69. Cales, C., Hancock, J.F., Marshall, C.J., and Hall, A. (1988) *Nature* 322, 548-551
70. Gibbs, J.B., Schaber, M.D., Allard, W.J., Sigal, I.S., and Scolnick, E.M. (1988) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 85, 5026-5030
71. Vogel, U.S., Dixon, R.A.F., Schaber, M.D., Diehl, R.E., Marshall, M.S., Scolnick, E.M., Sigal, I.S., and Gibbs, J.B. (1988) *Nature* 335, 90-93
72. Trahey, M., Wong, G., Halenbeck, R., Rubinfeld, B., Martin, G.A., Ladner, M., Long, C.M., Crosier, W.J., Watt, K., Kothe, K., and McCormick, F. (1988) *Science* 242, 1697-1700
73. Adari, H., Lowy, D.R., Willumsen, B.M., Der, C.J., and McCormick, F. (1988) *Science* 240, 518-521
74. McCormick, F. (1989) *Cell* 56, 5-8
75. Brandt, D.R., Asano, T., Pedersen, S.E., and Ross, E.M. (1983) *Biochemistry* 22, 4357-4362
76. Takai, Y., Kaibuchi, K., Kikuchi, A., and Kawata, M. (1992) *International Review of Cytology* 133, 187-230
77. Downward, J., Riehl, R., Wu, L., and Weinberg, R.A. (1990) *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 87, 5998-6002
78. Huang, Y.K., Kung, H.-F., and Kamata, T. (1990) *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 87, 8008-8012

79. Wolfman, A., and Macara, I. G. (1990) *Science* 248, 67-69
80. West, M., Kung, H.-F., and Kamata, T. (1990) *FEBS Lett.* 259, 245-248
81. Manne, V., Roberts, D., Tobin, A., O'Rourke, E., De Virglio, M., Meyers, C., Ahmed, N., Kurz, B., Resh, M., Kung, H.-F., and Barbacid, M. (1990) *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 87, 7541-7545
82. Reiss, Y., Goldstein, J. L., Seahra, M. C., Casey, P. J., and Brown, M. S. (1990) *Cell* 62, 81-88
83. Schaber, M. D., O'Hara, M. B., Garsky, V. M., Mosser, S. D., Bergstrom, J. D., Noores, S. L., Marshall, M. S., Friedman, P. A., Dixon, R. A. F., and Gibbs, J. B. (1990) *J. Biol. Chem.* 265, 14701-14704
84. Casey, P. J., Solski, P. A., Der, C. J., and Buss, J. E. (1989) *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 86, 8323-8327
85. Hancock, J. F., Magee, A. I., Childs, J. E., and Marshall, C. J. (1989) *Cell* 57, 1167-1177
86. Yokoyama, K., Goodwin, G. W., Ghomashchi, F., Glomset, J. A., and Gelb, M. H. (1991) *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 88, 5302-5306
87. Yoshida, Y., Kawata, M., Katayama, M., Horiuchi, H., Kita, Y., and Takai, Y. (1991) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 175, 720-728
88. Clarke, S., Vogel, J. P., Deschenes, R. J., and Stock, J. (1988) *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 85, 4643-4647
89. Deschenes, R. J., Stimmel, J. B., Clarke, S., Stock, J., and Broach, J. R. (1988) *J. Biol. Chem.* 264, 11865-11873
90. Tong, L., Milbur, M. V., Vos, A. M., Kim, S-H. (1989) *Science*, 245, 244
91. McGrath, J. P., Capon, D. J., Goeddel, D. V., Levinson, A. D. (1984) *Nature* 310, 644-649
92. Gibbs, J. B., Sigal, I. S., Poe, M., and Scolnick, E. M. (1984) *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 81, 5704-5708

93. Satoh, T., Endo, M., Nakafuku, M., Nakamura, S., and Kaziro, Y. (1990) *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 87, 5993-5997
94. Gibbs, J. B., Marshall, M. S., Scolnick, E. M., Dixon, R. A. F., and Vogel, U. S. (1990) *J. Biol. Chem.* 265, 20437-20447
95. Broek, D., Toda, T., Michaeli, T., Levin, L., Birchmeier, C., Zoller, M., Powers, S., and Wigler, M. (1987) *Cell* 48, 789-799
96. Camonis, J. (1986) *EMBO J.* 5, 375-381
97. Crechet, J.-B., Pouillet, P., Mistou, M.-Y., Parmeggiani, A., Camonis, J., Boy-Marcotte, E., Damak, F., and Jacquet, M. (1990) *Science* 248, 866-868
98. Fantle, W. J., Escobedo, J. A., Martin, G. A., Turck, C. W., Rosario, M., McCormick, F., and Williams, L. T. (1992) *Cell* 69, 413-423
99. Kazlauskas, A., Ellis, C., Pawson, T., and Cooper, J. A. (1990) *Science* 247, 1578-1581
100. Cichowski, K., McCormick, F., and Brusse, J. S. (1992) *J. Biol. Chem.* 267, 5025-5027
101. Ellis, C., Mokan, M., McCormick, F., and Pawson, T. (1990) *Nature* 343, 377-381
102. Mulder, K. M., and Morris, S. L. (1992) *J. Biol. Chem.* 267, 5029-5031
103. Smith, M. R., DeGudicibus, S. J., and Stacey, D. W. (1986) *Nature* 320, 540-543
104. Morrison, D. K., Kaplan, D. R., Rapp, V., and Roberts, T. M. (1988) *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 85, 8855-8859
105. Wong, G., Muller, O., Clark, R., Conroy, L., Moran, M. F., Polakis, P., and McCormick, F. (1992) *Cell* 69, 551-558
106. Settleman, J., Narasimhan, V., Foster, L. C., and Weinberg, R. A. (1992) *Cell* 69, 539-549
107. Didsbury, J., Weber, R. F., Bokoch, G. M., Evans, T., and Snyderman (1989)

- J. Biol. Chem. 264, 16378-16382
108. Polakis, P. G., Weber, R. F., Nevins, B., Didsbury, J. R., Evans, T., and Snyderman R. (1989) J. Biol. Chem. 264,
 109. Diekmann, D., Brill, S., Garrett, M. D., Totty, N., Hsuan, J., Monfries, C., Hall, C., Lim, L., and Hall, A. (1991) Nature 351, 400-402
 110. Xu, G., O'Connell, P., Viskochil, D., Cawthon, R., Robertson, M., Culver, M., Dunn, D., Stevens, J., Gesteland, R., White, R., and Weiss, R. (1990) Cell 62, 599-608
 111. Xu, G., Lin, B., Tanaka, K., Dunn, D., Wood, D., Gesteland, R., White, R., Weiss, R., and Tamano, F. (1990) Cell 63, 835-841
 112. Li, Y., Bollag, G., Clark, R., Stevens, J., Conroy, L., Fults, D., Ward, K., Friedman, E., Samowitz, W., Robertson, M., Bradley, P., McCormick, F., White, R., and Cawthon, R. (1992) Cell 69, 275-281
 113. DeClue, J. E., Papageorge, A. G., Fletcher, J. A., Diehl, S. R., Ratner, N., Vass, W. C., and Lowy, D. R. (1992) Cell 69, 265-273
 114. Kitayama, H., Sugimoto, Y., Matsuzaki, T., Ikawa, Y., and Noda, M. (1989) Cell 56, 77-84
 115. Pizon, V., Chardin, P., Lerosey, I., Olofsson, B., and Tavitian, A. (1988) Oncogene 3, 201-204
 116. Kawata, M., Matsui, Y., Kondo, J., Hishida, T., Teranishi, Y., and Takai, Y. (1988) J. Biol. Chem. 263, 18965-18971
 117. Der, C. J., Finkel, T., and Cooper, G. M. (1986) Cell 44, 167-176
 118. Hata, Y., Kikuchi, A., Sasaki, T., Schaber, M. D., Gibbs, J. B., and Takai, Y. (1990) J. Biol. Chem. 265, 7104-7107
 119. Frech, M., John, J., Pizon, V., Chardin, P., Tavitian, A., Clark, R., McCormick, F., and Wittinghofer, A. (1990) Science 249, 169-171
 120. Culine, S., Olofsson, B., Gosselin, S., Honore, N., and Tavitian, A. (1989)

- Int. J. Cancer 44, 990-994
121. Thomas, S.M., DeMarco, M., D'Arcangelo, G., Halegoua, S., and Brugge, J.S.
(1992) Mol. Cell Biol. 12, 936-945
 122. Ueda, T., Kikuchi, A., Ohga, N., Yamamoto, J., and Takai, Y. (1990) J. Biol. Chem. 265, 9373-9380
 123. Isomura, M., Kaibuchi, K., Yamamoto, T., Katayama, M., and Takai, Y. (1991) Biochem. Biophys. Res. Commun. 169, 612-635
 124. Garrett, M.D., Self, A.J., Oers, C., and Hall, A. (1989) J. Biol. Chem. 264, 10-13
 125. Morii, N., Kawano, K., Sekine, A., Yamada, T., and Narumiya, S. (1991) J. Biol. Chem. 266, 7646-7650
 126. Yamamoto, M., Marui, N., Sakai, T., Ikai, K., Imamura, S., Morii, N., Kozaki, S., and Narumiya, S. (1992) in press
 127. Chardin, P., Boquet, P., Madaule, P., Popoff, M.R., Rubin, E.J., and Gill, D.M. (1989) EMBO J. 8, 1087-1092
 128. Paterson, H.F., Self, A.J., Garret, M.D., Just, I., Aktries, K., and Hall, A. (1990) J. Cell Biol. 111, 1001-1007
 129. Morii, N., Teru-uchi, T., Tominaga, T., Kumagai, N., Kozaki, S., Ushikubi, F., and Narumiya, S. (1992) J. Biol. Chem. 267, 20921-20926
 130. Hirata, K., Kikuchi, A., Sasaki, T., Kuroda, S., Kaibuchi, K., Matsuura, Y., Seki, H., Saida, K., and Takai, Y. (1992) J. Biol. Chem. 267, 8719-8722